

**Fettsäuretransport in die peroxisomale Matrix von**  
*Arabidopsis thaliana*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Annett Struß**  
aus  
Boizenburg

Göttingen 2007

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2003 bis März 2007 in der Abteilung Biochemie der Pflanze unter Anleitung von Prof. Dr. Ivo Feußner am Albrecht von Haller Institut für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität zu Göttingen angefertigt.

D7

Referent: Prof. Dr. I. Feußner

Korreferentin: PD Dr. G. Lohaus

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.07

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungen

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Lipid-Mobilisierung während der Keimlingsentwicklung	1
1.2	Eigenschaften peroxisomaler Membranen	3
1.3	$\beta$ -Oxidation in <i>A. thaliana</i>	5
1.4	Peroxisomale ABC-Transporter	7
1.4.1	Peroxisomale ABC-Transporter aus Säugern	9
1.4.2	Peroxisomale ABC-Transporter aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.4.3	Pflanzliche peroxisomale ABC-Transporter	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit	18
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Chemikalien	19
2.2	Pflanzenmaterial und Anzucht	19
2.2.1	<i>A. thaliana</i>	19
2.2.2	Oberflächensterilisation von <i>A. thaliana</i> Saatgut	20
2.2.3	Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf MS-Medium	20
2.2.4	Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf Erde	20
2.2.5	<i>Ricinus communis</i>	21
2.3	Bakterien	21
2.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.5	Klonierungstechniken	26
2.5.1	Polymerase-Kettenreaktion	26
2.5.2	Restriktionsverdau	27
2.5.3	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.5.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.5.5	Dephosphorylierung	28
2.5.6	Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.6	Verwendete Plasmide	29
2.7	Oligonukleotide	30
2.8	Transformationsmethoden	30
2.8.1	Transformation von <i>E. coli</i>	30
2.8.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	31

2.8.3	Herstellung von <i>S. cerevisiae</i> Deletionsmutanten	31
2.8.4	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
2.8.5	Transformation von <i>A. thaliana</i>	33
2.8.6	Kreuzung von <i>A. thaliana</i>	33
2.8.7	Transiente Expression von Proteinen in Zwiebelepidermiszellen	34
2.9	Isolierung von Nukleinsäuren	35
2.9.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
2.9.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	36
2.9.3	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	36
2.9.4	Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	37
2.9.5	RNA-Isolierung aus pflanzlichen Gewebe	37
2.9.6	Isolierung von RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	37
2.10	Reverse Transkription	38
2.11	Histochemischer $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Assay	38
2.11.1	Herstellung der Promotor-GUS-Plasmide	38
2.11.2	Analyse der Promotoraktivität	39
2.12	Proteinanalysen	40
2.12.1	Expression rekombinanter Proteine	40
2.12.1.1	Expression in <i>E. coli</i>	40
2.12.1.2	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	41
2.12.2	Isolierung rekombinanter Proteine aus Membranen	41
2.12.3	Proteinbestimmung nach Bradford	42
2.12.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.12.5	Coomassie-Färbung	43
2.12.6	Western-Blot	44
2.12.6.1	Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen	44
2.12.6.2	Proteinnachweis über ‚Enhanced Chemiluminescence‘	44
2.13	DNA-Sequenzierung	45
2.14	Bestimmung von Acyl-CoA-Estern	46
2.14.1	Extraktion von Acyl-CoA-Estern aus <i>A. thaliana</i>	46
2.14.2	Extraktion von Acyl-CoA-Estern aus <i>S. cerevisiae</i>	47
2.14.3	Derivatisierung von Acyl-CoA-Estern	48
2.14.4	HPLC-Analyse von Acyl-etheno-CoA-Estern	48
2.15	Enzymatische Herstellung von Acyl-CoA-Estern	49

2.16	Saure Methanolyse	49
2.17	Analyse von FAME durch Gaschromatographie (GC)	50
2.18	Analyse von $\alpha$ -Oxidationsintermediaten mittels GC-MS	50
2.19	Lipidextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	51
2.20	Methylierung von freien Fettsäuren	51
2.21	Transmethylierung von veresterten Fettsäuren	52
2.22	Transportassays mit intakten Glyoxysomen	52
	2.22.1 Glyoxysomen aus etiolierten <i>A. thaliana</i> -Keimlingen	52
	2.22.2 Glyoxysomen aus etiolierten <i>R. communis</i> -Keimlingen	53
2.23	Bestimmung der Transportaktivität von PXA1 im rekonstituierten System	54
	2.23.1 Rekonstitution von Gesamtmembranproteinen in Liposomen	54
	2.23.2 Transport von freien und veresterten Fettsäuren in Proteoliposomen	55
2.24	Enzymaktivitätsbestimmungen	56
	2.24.1 Malat-Synthase (MS)-Aktivität	56
	2.24.2 Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität	57
	2.24.3 Thioesterase-Aktivität	57
	2.24.4 $\beta$ -Oxidations-Aktivität in isolierten Glyoxysomen	58
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
3.1	Untersuchungen zur $\beta$ -Oxidation der Mutante <i>lacs6 lacs7 pxa</i>	59
	3.1.1 Herstellung der Dreifach-Mutante <i>lacs6 lacs7 pxa</i>	59
	3.1.2 Die Mutanten <i>lacs6 lacs7</i> und <i>pxa1-2</i> komplementieren sich nicht im Transport der Fettsäuren	62
	3.1.3 Untersuchung der $\alpha$ -Oxidation in der <i>lacs6 lacs7 pxa</i> -Mutante	63
	3.1.4 Anhäufung von langkettigen Acyl-CoA-Estern während der frühen Keimlingsentwicklung in der <i>lacs6 lacs7 pxa</i> -Mutante	64
	3.1.5 Erhöhte Biosynthese von sehr langkettigen Acyl-CoA-Estern in <i>lacs6 lacs7 pxa</i>	66
3.2	Bedeutung peroxisomaler LACS vs. zytoplasmatischer LACS in <i>A. thaliana</i>	67
3.3	Expressionsanalyse des PXA1-Transporters und der peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetase LACS7 in verschiedenen Wachstumsstadien	70
3.4	Untersuchungen zum Keimungsphänotyp von PXA1	73
3.5	Interaktion zwischen PXA1 und LACS6/LACS7	76
3.6	Transportstudien an intakten Glyoxysomen	79
	3.6.1 Fettsäuretransport in Glyoxysomen aus <i>A. thaliana</i> und <i>R. communis</i>	79

3.6.2	Glyoxysomale $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren	82
3.7	Untersuchung des peroxisomalen PXA1-Transporters im rekonstituierten System	85
3.7.1	Expression von PXA1 in <i>S. cerevisiae</i>	86
3.7.2	Fettsäuretransport in Proteoliposomen	87
3.8	Komplementationsstudien mit dem pflanzlichen Transporter PXA1 in <i>S. cerevisiae</i>	91
3.8.1	Herstellung der Mutantenstämme <i>pat1</i> $\Delta$ und <i>pat1</i> $\Delta$ <i>faa2</i> $\Delta$	91
3.8.2	Wachstumsverhalten der transformierten Mutantenstämme <i>pat1</i> $\Delta$ und <i>pat1</i> $\Delta$ <i>faa2</i> $\Delta$ auf Fettsäure-haltigem Medium	93
3.9	Metabolisierung exogen zugeführter Fettsäuren in <i>S. cerevisiae</i>	97
3.10	Fat2p ist in den Fettsäuremetabolismus involviert	101
3.10.1	Eine Deletion des <i>FAT2</i> -Gens führt zu einem synthetisch letalen Wachstumsphänotyp in Kombination mit einer <i>PAT1</i> - als auch mit einer <i>FAA2</i> -Deletion	102
3.10.2	Das Wachstum auf Oleatmedium in <i>S. cerevisiae</i> ist unabhängig von Tes1p	103
3.10.3	Nachweis der ACS-Aktivität von Fat2p	105
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>107</b>
4.1	Ist eine verstärkte Fettsäureelongation ein generelles Merkmal einer beeinträchtigten $\beta$ -Oxidation?	107
4.2	Expressionsanalysen von LACS und PXA1 lassen auf eine vom TAG-Abbau unabhängige Stoffwechselaktivität während der Keimung schließen	110
4.3	Die Fähigkeit zum Brechen der Dormanz ist nicht an eine Domäne des PXA1-Transporters gekoppelt	113
4.4	ACS stimuliert transporterunabhängig den Transport von Fettsäuren durch die Membran	114
4.5	Transport von langkettigen Fettsäuren und Acyl-CoA-Estern in isolierte Peroxisomen aus <i>R. communis</i>	116
4.6	Transportuntersuchungen in Proteoliposomen	117
4.7	Wachstumsverhalten der <i>S. cerevisiae</i> -Mutanten <i>pat1</i> $\Delta$ und <i>pat1</i> $\Delta$ <i>faa2</i> $\Delta$	119
4.8	Peroxisomale ACS-Aktivität- eine notwendige Voraussetzung für die $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren in <i>S. cerevisiae</i> ?	120
4.9	Fettsäureimportmodelle in <i>A. thaliana</i> und <i>S. cerevisiae</i>	123

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>125</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>128</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>142</b>
7.1	Plasmidkarten	142
7.2	Oligonukleotide	144

**Vielen Dank**

**Lebenslauf**

## Abkürzungen

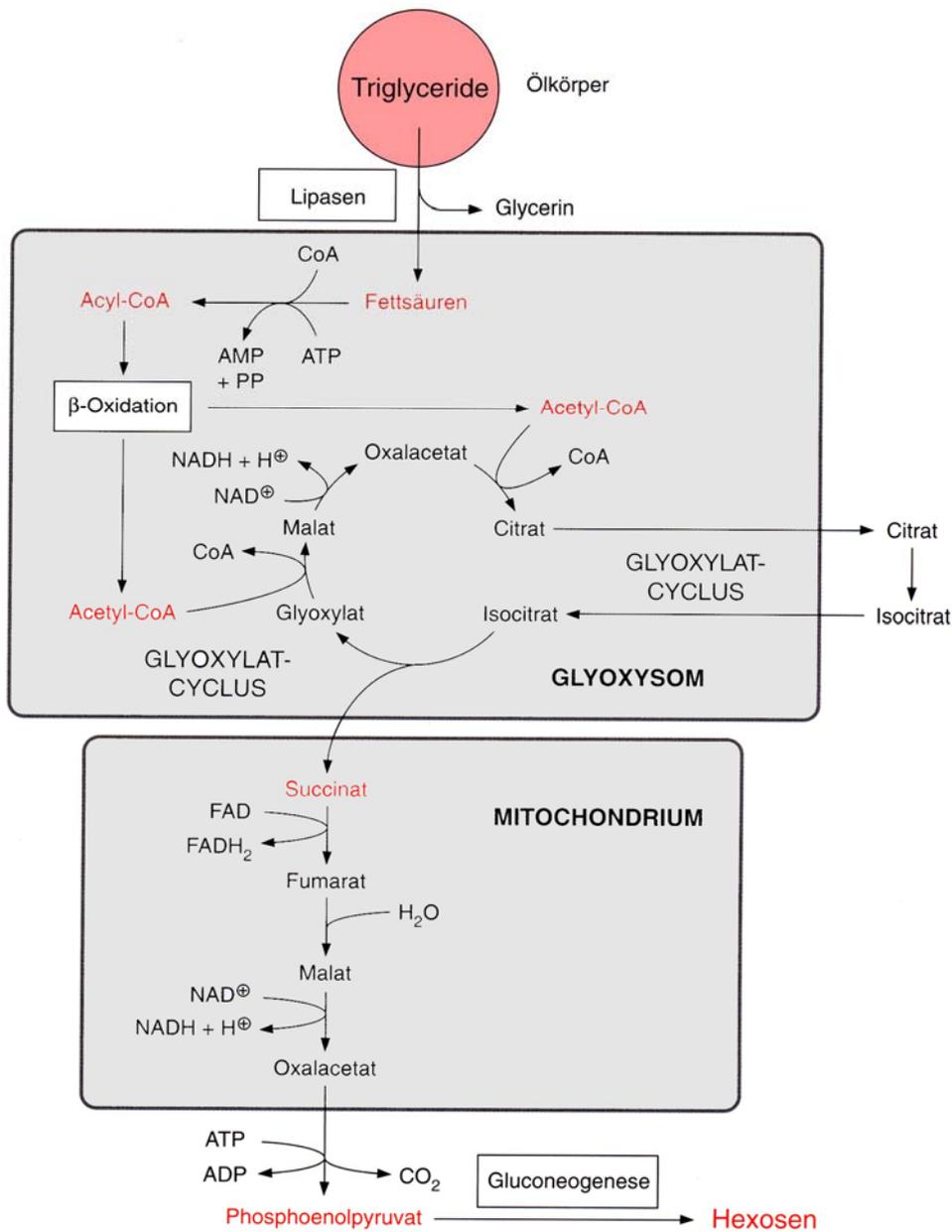
Abb.	Abbildung
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
A. dest	lat. <i>Aqua destillata</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	engl. Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Carb	Carbenicillin
clonNAT	Nourseothricin
cDNA	engl. complementary DNA
Ci	Curie
CoA	Coenzym A
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EYFP	engl. enhanced yellow fluorescence protein
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
f	femto
FAME	Fettsäuremethylester
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
G418	Geneticin
h	engl. hour(s) = Stunde
HPLC	engl. high pressure liquid chromatography = Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Hyg	Hygromycin B
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktosid
k	kilo
kb	Kilobasenpaar(e)
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria Bertani
LACS	engl. long chain fatty acid acyl CoA synthetase = ACS mit Spezifität für langkettige Fettsäuren
LCFA	engl. long chain fatty acid = langkettige Fettsäure
m	milli
$\mu$	mikro
mm	Millimeter
mM	millimolar
M	molar
min	Minute
mol	Mol
n	nano

nkat	Einheit der Enzymaktivität (1 U = 16,67 nkat $\mu$ mol/min)
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
ORF	engl. Open reading frame = offener Leserahmen
p	piko
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	engl. Polymerase chain reaction = Polymerase Kettenreaktion
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i> = Wasserstoffionenkonzentration
PTS	engl. peroxisomal targeting signal
RNA	engl. Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	engl. rounds per minute
s	Sekunde
SDS	engl. Sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
TAG	Triacylglycerin
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylen diamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
VLCFA	engl. Very long chain fatty acid = sehr langkettige Fettsäure
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
vs.	lat. <i>versus</i> = gegen
WT	Wildtyp
w/v	engl. Weight per volume = Gewicht pro Volumen

## 1. Einleitung

### 1. 1 Lipid-Mobilisierung während der Keimungsentwicklung

Pflanzen speichern Lipide als Triglyceride (TAGs) in so genannten Ölkörpern. Diese Ölkörper sind sphärische Organellen mit einem Durchmesser von 0,5 bis 2  $\mu\text{m}$ . Sie bestehen aus einer TAG-Matrix, die von einer einfachen Phospholipidschicht umgeben ist. Proteine, die in dieser Membran lokalisiert sind, haben sowohl strukturelle als auch enzymatische Funktionen (Kindl, 1987). Die am häufigsten auftretenden Proteine am Ölkörper sind Oleosine. Sie bedecken die gesamte Oberfläche von Ölkörpern und haben vermutlich eine strukturelle Funktion. Aufgrund der Wechselwirkung der Oleosine mit den Phospholipiden wird eine stabile amphipathische Schicht auf der Oberfläche der TAGs gebildet, welche die Integrität der Lipidkörper aufrechterhält (Huang, 1994). Weiterhin wird vermutet, dass Oleosine als Dockingproteine für Enzyme dienen, die während der Keimung neu synthetisiert werden und an der Metabolisierung der Speicherlipide beteiligt sind (Chen *et al.*, 1999). Während der Keimung werden TAGs mit hoher Selektivität durch Triacylglyceridlipasen (TGLs), die ebenfalls mit der Membran der Ölkörper assoziiert sind, zu Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysiert (Adlercreutz *et al.*, 1997). Die freigesetzten Fettsäuren werden anschließend in spezialisierte Peroxisomen so genannte Glyoxysomen transportiert, um dort als aktivierte CoA-Thioester durch  $\beta$ -Oxidation in Acetyl-CoA-Moleküle abgebaut zu werden. Der Transport von Fettsäuren in die peroxisomale Matrix stellt dabei ein besonderes Problem dar, da Fettsäuren selbst wichtige Membranbestandteile sind und sich aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften nur bedingt in Wasser lösen. Es ist bekannt, dass an dem Transport von Fettsäuren in Peroxisomen Fettsäure-bindende Proteine, Acyl-CoA-Synthetasen sowie ‚ATP-binding cassette‘-(ABC)-Transporter beteiligt sind. Der exakte Transportmechanismus ist jedoch noch nicht geklärt. Pflanzen sind in der Lage, das aus der  $\beta$ -Oxidation gebildete Acetyl-CoA in Glukose umzuwandeln, da sie den Enzymapparat des Glyoxylatzyklus besitzen. Durch den Glyoxylatzyklus werden aus zwei Molekülen Acetyl-CoA ein Molekül Succinat gebildet. Dieses wird durch den Tricarbonsäurezyklus in den Mitochondrien zu Oxalacetat umgesetzt. Das ins Zytosol transportierte Oxalacetat wird in Phosphoenolpyruvat umgewandelt und ist nun Ausgangssubstrat für die Synthese von Hexosen in der Gluconeogenese (Abb. 1).



**Abb. 1 Mobilisierung der Speicherlipide zur Synthese von Hexosen während der Keimlingsentwicklung (aus Heldt, 1999).** Erläuterung im Text.

Die Entwicklung des Keimlings ist von dieser heterotrophen Ernährung abhängig. Beim Ablauf der  $\beta$ -Oxidation und des Glyoxylatzyklus in den Peroxisomen entstehen die toxischen Zwischenprodukte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Glyoxylat. Durch die Kompartimentierung dieser beiden Stoffwechselwege wird vermieden, dass diese toxischen Zwischenprodukte in das Zytosol gelangen. Peroxisomen erhielten ihren Namen ursprünglich aufgrund des Besitzes von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierenden Oxidasen und Katalasen, welche das gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sofort abbauen (Purdue und Lazarow, 2001).

In photosynthetisch aktivem Gewebe ergrünender Keimlinge werden die Glyoxysomen in Peroxisomen umgewandelt und sind damit am Glycolatstoffwechsel (Photorespiration) beteiligt (Nishimura *et al.*, 1986). Während der Seneszenz erfolgt eine Differenzierung von Blatt-Peroxisomen zu Gerontosomen (Vicentini und Matile, 1993). Die  $\beta$ -Oxidation dient hier dem Recycling von nicht mehr benötigten Fettsäuren. Die Proteinausstattung von Peroxisomen und die damit verbundenen metabolischen Funktionen sind abhängig von der Entwicklungsphase und dem Zelltyp der Pflanze (Beevers, 1979; Purdue und Lazarow, 2001). Diese vielfältigen Stoffwechselfunktionen der Peroxisomen erfordern einen kontrollierten Zugang und Austritt von Stoffen durch die Membran.

## 1.2 Eigenschaften peroxisomaler Membranen

Peroxisomen sind kugelförmige Zellorganellen mit einem Durchmesser von 0,2-1,5  $\mu\text{m}$ , die im Gegensatz zu Mitochondrien und anderen Plastiden von einer einfachen Phospholipid-Doppelschicht umgeben sind. Die Peroxisomen sind die einzigen Organellen, deren Synthese und evolutionäre Entstehung nicht vollständig aufgeklärt sind. Die Herkunft der Peroxisomen war bisher von der Vorstellung geprägt, dass diese durch Teilung vorhandener Peroxisomen entstehen. Neuere Untersuchungen belegen allerdings, dass das Endoplasmatische Retikulum (ER) als Ursprungsort der Peroxisomen zu sehen ist (Hoepfner *et al.*, 2005). Hierbei schnüren sich Vorläufervesikel vom ER ab, die dann zu der endgültigen Zellorganelle fusionieren. Durch phylogenetische Untersuchungen von peroxisomalen Proteinen konnte ein endosymbiontischer Ursprung für die Peroxisomen weitestgehend ausgeschlossen werden und die Abstammung vom ER bestätigt werden (Schluter *et al.*, 2006).

Im Widerspruch zu der Hypothese, nach der das ER der Ursprungsort der peroxisomalen Membranlipide ist, stehen Untersuchungen an Baumwoll-Keimlingen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein großer Prozentsatz der Membranlipide aus den Ölkörpern in wachsende Glyoxysomen eingebaut wird (Chapman und Trelease, 1991). Dafür spricht auch die räumliche Nähe der Ölkörper zu den Peroxisomen (Vigil, 1970; Trelease *et al.*, 1971).

Da Peroxisomen weder über ein eigenes Genom noch über eigene Ribosomen verfügen, werden alle peroxisomalen Matrix- und Membranproteine von freien Ribosomen im Zytosol synthetisiert und anschließend im ungefalteten Zustand zu den Peroxisomen transportiert (Lazarow und Fujiki, 1985). Für den Import peroxisomaler Matrixproteine sind bestimmte Lokalisierungssequenzen (PTS1 und PTS2) verantwortlich. Der Import der PTS1- bzw. PTS2-Proteine erfordert mehr als 20 Peroxine, die von PEX-Genen kodiert werden (Titorenko

und Rachubinski, 2001). Im Gegensatz zu den Matrixproteinen ist der Transportmechanismus für peroxisomale Membranproteine noch weitgehend unverstanden. Darüber hinaus sind bisher nur sehr wenige peroxisomale Transmembranproteine in *Arabidopsis thaliana* bekannt. Die charakteristische Protein-Lipid-Zusammensetzung der Peroxisomenmembran reguliert den Import und Export von Ionen, Kofaktoren, Metaboliten, Proteinen und Fettsäuren. Die Phospholipid-Doppelschicht ist *per se* nur für niedermolekulare hydrophobe Moleküle über Diffusion frei durchlässig. Eine selektive Permeabilität von polaren, hydrophilen, gelösten Stoffen und Makromolekülen wird durch spezifische Proteine vermittelt. Die Membranen isolierter Peroxisomen aus der Leber von Ratten scheinen für kleinere Metabolite durchlässig zu sein, jedoch nicht für die Kofaktoren NAD(P)H und CoA (Antonenkov *et al.*, 2004). Weitere Studien zeigten, dass Porine, die als wassergefüllte Poren betrachtet werden können, entweder unspezifisch den Durchtritt von Stoffen vermitteln oder über spezifische Substratbindungsstellen verfügen. Die kanal- oder porenvermittelte Diffusion ermöglicht den thermodynamisch begünstigten Transport von Substanzen in Richtung eines vorhandenen Konzentrationsgefälles (Reumann, 2000; Sulter *et al.*, 1993; Reumann *et al.*, 1997; Van Veldhoven *et al.*, 1987).

Der pH-Gradient zwischen Zytosol und peroxisomaler Matrixseite lässt vermuten, dass der Transport von Protonen zwischen diesen beiden Kompartimenten kontrolliert wird (Dansen *et al.*, 2000; van Roermund *et al.*, 2004; Lasorsa *et al.*, 2004). Möglicherweise wird dieser pH-Gradient als treibende Kraft für den Transport von Metaboliten wie Fettsäuren genutzt (van Roermund *et al.*, 2004). Es wird auch vermutet, dass dieser Gradient als Konsequenz aus dem Metabolitentransport entsteht (Palmieri *et al.*, 2001).

Der Transport von Fettsäuren durch die Membran wird kontrovers diskutiert. Zum einen wird der Transport von Fettsäuren durch passive Diffusion favorisiert und zum anderen der energieabhängige, proteinvermittelte Transport. Untersuchungen zeigten, dass freie Fettsäuren proteinfreie, künstliche Membranen in physiologisch relevanter Geschwindigkeit durch Diffusion passieren können (Hamilton, 1998). Für den proteinvermittelten Transport von Fettsäuren spricht jedoch der Befund, dass für andere, ebenfalls membrandurchlässige Moleküle, wie Ammonium und Wasser bereits membrangebundene Transporter gefunden wurden (Chrispeels und Maurel, 1994). Diese regulieren die Transportrate, die Selektivität und die Koordination mit anderen zellulären Prozessen. Die Aufnahme von Fettsäuren ist zudem zellspezifisch und kann durch verschiedene Stoffe inhibiert werden (Fitscher *et al.*, 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Fettsäuren einer Sättigungskinetik folgt und der Transport von Fettsäuren durch Membranen in verschiedenen

eukaryotischen Organismen durch ABC-Transporter beeinflusst wird (Theodoulou *et al.*, 2006; Wanders *et al.*, 2007).

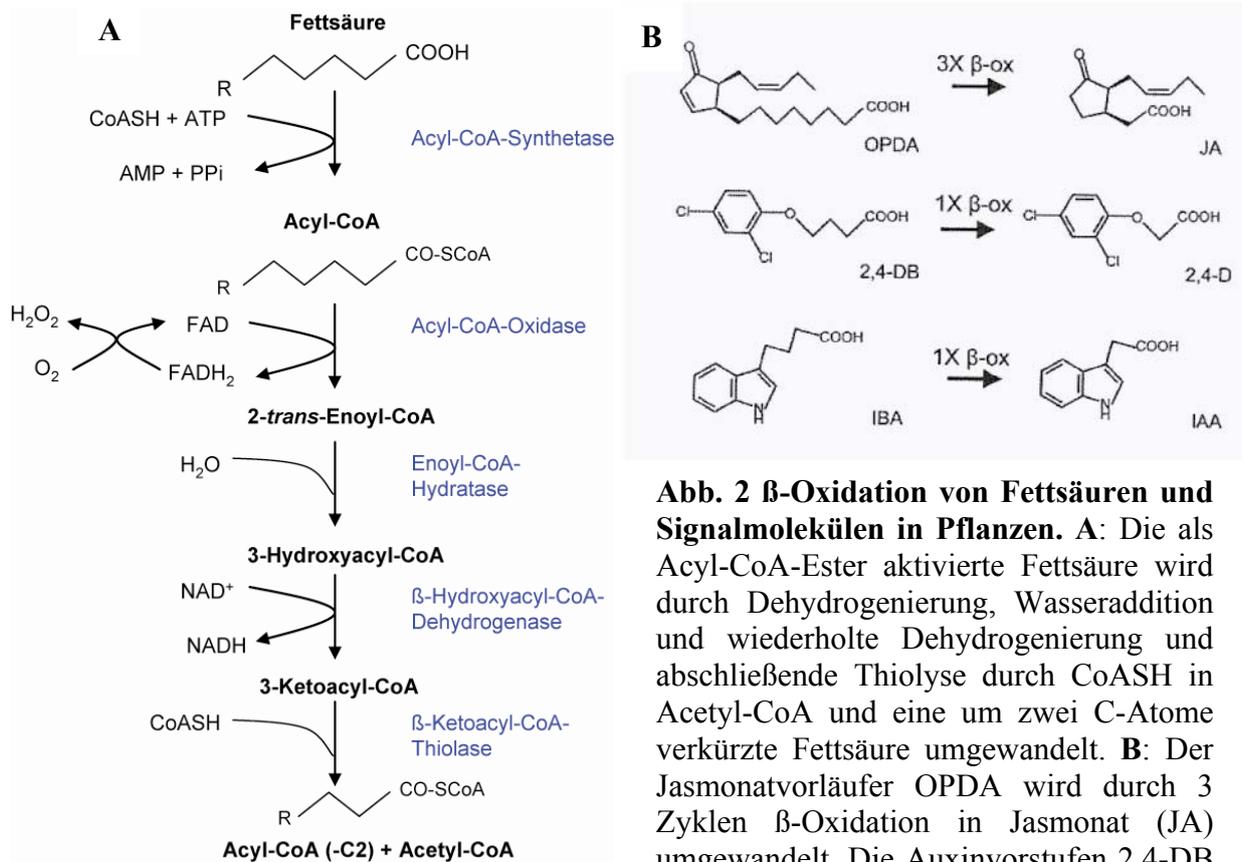
### 1.3 $\beta$ -Oxidation in *A. thaliana*

Die  $\beta$ -Oxidation ist der wichtigste katabolische Prozess zum Abbau von Fettsäuren. Darüber hinaus ist die  $\beta$ -Oxidation in *A. thaliana* für die Produktion von Signalmolekülen wie Jasmonsäure, Indol-3-essigsäure und möglicherweise Salicylsäure aus Vorläufermolekülen verantwortlich (Abb. 2; Graham und Eastmond, 2002; Theodoulou *et al.*, 2006).

Während in menschlichen Zellen die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren auf die Mitochondrien und die Peroxisomen verteilt ist, beschränkt sich der Abbau von Fettsäuren in Pflanzen und Pilzen auf die Peroxisomen. Der Transport der Substrate für die  $\beta$ -Oxidation in die Peroxisomen ist die Voraussetzung für diesen Abbauprozess. Unabhängig davon, ob die Fettsäuren passiv oder durch proteinvermittelten Transport in die Peroxisomen gelangen, ist in jedem Fall eine Aktivierung zu Acyl-CoA-Estern erforderlich für den folgenden Zyklus der  $\beta$ -Oxidation (Fulda *et al.*, 2004). Die Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, heißen Acyl-CoA-Synthetasen. Unter Verbrauch von ATP wird eine Thioesterbindung zwischen der Carboxylgruppe der Fettsäure und der Sulfhydrylgruppe des Coenzym A gebildet. Die Aktivierung erfolgt in zwei Schritten. Zuerst reagiert die Fettsäure mit ATP zu einem Acyladenylat, dabei ist die Carboxylgruppe einer Fettsäure an die Phosphorylgruppe des AMP gebunden. Die Sulfhydrylgruppe des CoA greift dann das fest an das Enzym gebundene Acyladenylat an, wodurch Acyl-CoA und AMP entstehen. Die Acyl-CoA-Synthetase überführt somit hydrophobe Fettsäuremoleküle in die entsprechenden wasserlöslichen CoA-Ester. In *A. thaliana* sind insgesamt neun Acyl-CoA-Synthetasen mit einer Präferenz für langkettige (C14-C22) Fettsäuren beschrieben worden, von denen zwei peroxisomal sind (Fulda *et al.*, 2002). Beim Abbau der Fettsäuren erfolgt nach der Bildung von einem Thioester eine immer wiederkehrende Sequenz von vier Reaktionen: eine Oxidation unter Beteiligung von Flavinadenindinucleotid (FAD), eine Wasseranlagerung, eine Oxidation unter Beteiligung von  $\text{NAD}^+$  und eine Thiolyse durch CoA (Kunau *et al.*, 1995). Die resultierende Fettsäurekette wird dabei um zwei Kohlenstoffatome verkürzt, und  $\text{FADH}_2$ ,  $\text{NADH}$  und Acetyl-CoA werden erzeugt (Abb. 2). Jede Abbaurunde beginnt mit der Oxidation des Acyl-CoA durch eine Acyl-CoA-Oxidase unter Entstehung eines Enoyl-CoA. Bei dieser Reaktion wird der Wasserstoff über die FAD-abhängige Oxidase in einer irreversiblen Reaktion auf  $\text{O}_2$  übertragen. Das toxische  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird am Ort der Entstehung von einer vorhandenen Katalase

durch Spaltung in Wasser und Sauerstoff eliminiert. Als nächstes wird durch die Hydratisierung des Enoyl-CoAs Hydroxyacyl-CoA gebildet. Das Enzym, das diesen Schritt katalysiert, heißt Enoyl-CoA-Hydratase. Bei der nachfolgenden zweiten Oxidation wird der Wasserstoff mit Hilfe der  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase auf NAD übertragen. Das gebildete  $\beta$ -Ketoacyl-CoA wird durch CoA-SH vermittelte Thiolyse in einer irreversiblen Reaktion in ein Molekül Acetyl-CoA und ein um zwei C-Atome verkürztes Acyl-CoA gespalten. Beim Abbau von ungesättigten Fettsäuren entstehen Zwischenprodukte (z.B.  $\Delta^3$ -cis-Enoyl-CoA), deren weitere Metabolisierung durch die  $\beta$ -Oxidation nicht möglich ist. Durch eine zusätzliche Isomerisierung dieser Intermediate wird der weitere Abbau über die  $\beta$ -Oxidation ermöglicht.

Im Unterschied zum beschriebenen pflanzlichen  $\beta$ -Oxidationssystem werden in menschlichen Zellen mittel- und langkettige Fettsäuren in Mitochondrien oxidiert (Eaton *et al.*, 1996). Sehr langkettige Fettsäuren (>C22) werden zunächst in Peroxisomen über  $\beta$ -Oxidation verkürzt und anschließend in den Mitochondrien vollständig abgebaut. Der Transport dieser Acyl-CoA-Ester von den Peroxisomen in die Mitochondrien wird über zwei Wege postuliert. Der erste Weg beinhaltet die Umwandlung von Acyl-CoA in Acylcarnitin, wobei die Acylgruppe vom Schwefelatom des Coenzym A auf die Hydroxylgruppe des Carnitins übertragen wird. Diese Reaktion wird katalysiert von einer der zwei peroxisomalen Carnitin-Acyltransferasen. Der Transportweg des Acylcarnitins von den Peroxisomen ins Zytosol ist nicht bekannt. Das ins Zytosol transportierte Acylcarnitin wird dann von einem mitochondrialen Carnitin/Acylcarnitin-Transporter in die mitochondriale Matrix geschleust. Die Acylgruppe wird auf der Matrixseite wieder auf CoA übertragen und weiter oxidiert zu Acetyl-CoA, welches im Citratzyklus weiterverwendet werden kann, um ATP zu gewinnen. Das zweite Modell beschreibt die Spaltung der Thioester in den Peroxisomen durch eine Acyl-CoA Thioesterase (Hunt und Alexson, 2002), gefolgt von dem Transport der freien Fettsäuren ins Zytosol und der Aufnahme in die Mitochondrien. Dort werden die Fettsäuren aktiviert und  $\beta$ -oxidiert (Wanders *et al.*, 2007).



**Abb. 2  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und Signalmolekülen in Pflanzen.** A: Die als Acyl-CoA-Ester aktivierte Fettsäure wird durch Dehydrogenierung, Wasseraddition und wiederholte Dehydrogenierung und abschließende Thiolyse durch CoASH in Acetyl-CoA und eine um zwei C-Atome verkürzte Fettsäure umgewandelt. B: Der Jasmonatvorläufer OPDA wird durch 3 Zyklen  $\beta$ -Oxidation in Jasmonat (JA) umgewandelt. Die Auxinvorstufen 2,4-DB und IBA benötigen nur einen Zyklus  $\beta$ -Oxidation für die Bildung von 2,4-D bzw. IAA (Abb. 2 B übernommen aus Theodoulou *et al.*, 2006).

#### 1.4 Peroxisomale ABC-Transporter

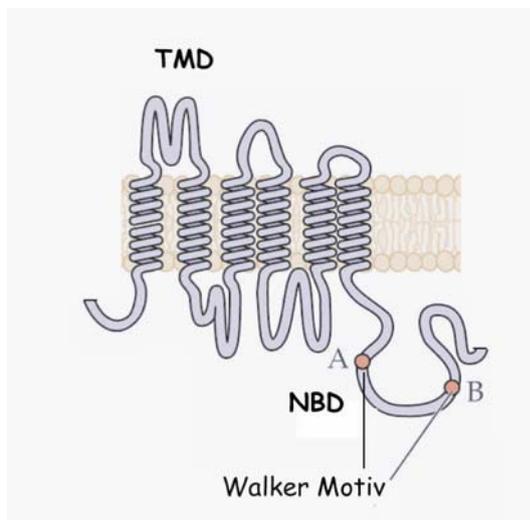
Es ist bekannt, dass ABC-Transporter eine beträchtliche medizinische und ökonomische Bedeutung haben. Sie sind für eine Vielzahl von Funktionen der Zelle verantwortlich, unter anderem für den Transport von Fettsäuren in die peroxisomale Matrix. Hier soll die Familie der peroxisomalen ABC-Transporter näher vorgestellt werden.

ABC-Transporter gehören zu einer der größten bisher bekannten Proteinfamilien. Die Mitglieder dieser Familie nutzen Energie, die aus der Hydrolyse von ATP gewonnen wird, um diverse Substrate gegen einen Gradienten durch die Zellmembran zu schleusen (Dean, 2005). Trotz der Variabilität ihrer Substrate besitzen alle ABC-Transporter einen modularen Aufbau aus zwei Transmembrandomänen (TMD) und zwei Nukleotid-bindende Domänen (NBD), die den funktionellen Transporter bilden. Obwohl diese vier Module in unterschiedlichen Variationen miteinander kombiniert sein können, beruht die Definition eines ABC-Transporters einzig und allein auf charakteristischen Sequenzmotiven, die in der

NBD lokalisiert sind. So befinden sich die so genannten Walker A- und Walker B-Motive, die durch 90-120 Aminosäuren voneinander getrennt sind, sowie das ABC-Signaturmotiv innerhalb der NBD (Higgins *et al.*, 1986; Walker *et al.*, 1982) (Abb. 3). Die Sequenzen der Membrandomänen weisen einen vergleichsweise geringen Konservierungsgrad auf und schaffen damit die Voraussetzung für eine individuelle Substratbindung. Eine Membrandomäne besteht aus 6-11 hydrophoben Segmenten, die durch Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen die Membran durchspannen. Ein eukaryotischer ABC-Transporter liegt normalerweise als Dimer vor, wobei jedes der Dimere aus einer hydrophoben TMD und einer hydrophilen NBD besteht. Eine Ausnahme bildet der peroxisomale ABC-Transporter PXA1 aus *A. thaliana*. Bei diesem Volltransporter sind die beiden Dimere von einem Gen kodiert. Im Gegensatz dazu werden bei den so genannten Halbtransportern diese beiden Domänen von bis zu zwei Genen kodiert, wobei ein funktioneller Transporter erst nach einer Homo- oder Heterodimerisierung entsteht. Beim Menschen sind die meisten der ca. 48 bekannten ABC-Transporter jedoch Monomere (Halbtransporter), die aber ebenfalls aus insgesamt zwei TMD und zwei ATP bindenden Kassetten bestehen. Prokaryotische ABC-Transporter sind in der Regel Tetramere, die aus vier separat exprimierten Proteindomänen entstehen. Ein funktioneller Transporter kann sowohl zwei verschiedene TMDs und NBD, als auch aus zwei Homodimeren, oder aus einer Kombination von Homo- und Heterodimeren bestehen.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Genome verschiedenster Organismen vollständig sequenziert. Die Suche nach den bekannten konservierten Sequenzmotiven eines ABC-Transporters erlaubte die Identifizierung von neuen ABC-Transporter-Genen in Menschen, Pflanzen (*A. thaliana*, *Oryza sativa*), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), Stechmücken (*Anopheles gambiae*), Pilzen (*Saccharomyces cerevisiae*) und Prokaryoten (*Lactococcus lactis*) (Übersicht: Theodoulou *et al.*, 2006). ABC-Transporter werden aufgrund ihrer Sequenzhomologien bzw. Substrateigenschaften in Subgruppen eingeteilt. Jedes Mitglied einer Gruppe weist dieselbe Domänenstruktur auf. Die peroxisomalen ABC-Transporter gehören zur Gruppe D bzw. ABCD. Diese Subfamilie ist nach der erblichen X-chromosomalen neurodegenerativen Störung, der Adrenoleukodystrophie benannt. Die Ursache für diese Erkrankung ist ein Defekt des peroxisomalen ALD-Proteins. Die Mitglieder der ABCD-Subfamilie aus verschiedenen Organismen sind in einer Übersicht von Theodoulou *et al.* (2006) dargestellt. Alle Gene weisen eine Domänenstruktur der Form TMD-NBD auf, wobei die pflanzlichen Vertreter *Arabidopsis thaliana* (PXA1) und *Oryza sativa* (*OsCTS1*) mit der Domänenstruktur TMD-NBD-TMD-NBD eine Ausnahme bilden.

Aus Untersuchungen an zahlreichen Systemen über die Funktionsweise eines ABC-Transporters ist bisher bekannt, dass die ATP-Hydrolyse an einer Domäne die Hydrolysefunktion der anderen Domäne aktiviert. Weiterhin hat die Inaktivierung der ATPase-Aktivität einer Domäne den vollständigen Verlust der Transportfunktion zur Folge, wobei sich beide Domänen gleich verhalten. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich nicht nur, dass beide ABC-Domänen benötigt werden, sondern auch, dass sie nicht unabhängig voneinander aktiv sein können (Schneider und Hunke, 1998).



**Abb. 3: Modell eines Halbtransporters (modifiziert nach Buchanan *et al.*, 2000).**

Der Halbtransporter besteht aus einer zyttoplasmatischen Nukleotidbindedomäne (NBD) mit dem konservierten Walker A- und Walker B-Motiven und einer Transmembrandomäne (TMD).

#### 1.4.1 Peroxisomale ABC-Transporter aus Säugern

Es wurden bisher vier ABC-Transporter in menschlichen Peroxisomen entdeckt: PMP70/ABCD3 (Kamijo *et al.*, 1990), ALDP/ABCD1 (Mosser *et al.*, 1993), ALDR/ABCD2 (Lombard-Platet *et al.*, 1996) und PMP69/ABCD4 (Holzinger *et al.*, 1997; Shani *et al.*, 1997). Bei allen genannten Proteinen handelt es sich um Halbtransporter, die durch Dimerisierung einen funktionell aktiven Transporter bilden. Es wird vermutet, dass die Wahl des Dimerisierungspartners die Substratspezifität des Transporters bestimmt (Ewart *et al.*, 1994). Liu *et al.* (1999) postulierten, dass sowohl Homo- als auch Heterodimerisierung zwischen den Proteinen ALDP, ALDR und PMP70 stattfindet. Diese Aussage basiert auf Ergebnissen von ‚two hybrid‘-Analysen, wobei nur die carboxyterminalen hydrophilen Domänen getestet wurden und Koimmunpräzipitationsanalysen. So konnte gezeigt werden, dass ALDP

Homodimere als auch Heterodimere mit PMP70 oder ALDRP bilden kann. Darüber hinaus wurde die Bildung von Heterodimeren zwischen ALDRP und PMP70 nachgewiesen. Zu ähnlichen Aussagen kamen Smith *et al.* (1999), die ebenfalls die Proteininteraktionen der Halbtransporter untersuchten. In einer dritten Studie wurden Interaktionen von ALDP und PMP70 mit anderen peroxisomalen Proteinen nachgewiesen (Tanaka *et al.*, 2002). Gegensätzliche Aussagen wurden kürzlich von Guimaraes *et al.* (2004) und Kashiwayama *et al.* (2002) getroffen, die behaupten, dass ALDP und PMP70 hauptsächlich als Homodimere in der Membran vorliegen. Weitere Studien zeigten, dass ALDP und ALDR sehr unterschiedliche Expressionsprofile in Geweben der Maus und in menschlichen Zelllinien aufweisen (Troffer-Charlier *et al.*, 1998). Dies deutet daraufhin, dass ALDP und ALDR keine obligatorischen Partner sind, sondern stattdessen ähnliche Funktionen in verschiedenen Zelltypen erfüllen können.

Die meisten Informationen über mögliche Funktionen eines ABCD-Transporters sind über ALDP erhältlich. ALDP ist ein integrales Membranprotein mit einer ins Zytoplasma gerichteten NBD. Mutationen im *ABCD1* Gen welches für das ALDP Protein kodiert, verursachen X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD) (Moser *et al.*, 2000; Dubois-Dalcq *et al.*, 1999). Diese Erbkrankheit tritt meist im Kindesalter auf und bringt einen schnellen neurologischen Verfall mit sich. Biochemisches Merkmal dieser Stoffwechselkrankheit ist die Anhäufung von sehr langkettigen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren wie C24:0, C26:0 und C26:1 vor allem in der Nebennierenrinde und der weißen Gehirns substanz. Sehr langkettige Fettsäuren werden auch in Zellmembranen eingelagert. Diese erhöhten Fettsäure-Mengen werden auf die zu 60-80 % reduzierte Fähigkeit zur  $\beta$ -Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren zurückgeführt. Da der Enzymapparat der  $\beta$ -Oxidation von der *ABCD1*-Mutation nicht beeinflusst ist, wird vermutet, dass ALDP verantwortlich ist für den Transport der Fettsäuren (oder alternativ: sehr langkettige Acyl-CoA-Ester oder Kofaktoren: CoA, ATP) über die Peroxisomenmembran. Substrat-induzierte Konformationsänderungen von ALDP zeigen, dass der Transporter direkt in den Transport von ‚long-chain‘ (LCFA, C14-C20) oder ‚very-long-chain fatty acids‘ (VLCFA, >C22) durch die Peroxisomenmembran beteiligt ist (Guimaraes *et al.*, 2005). Alternative Funktionen des Transporters werden aufgrund von Untersuchungen der  $\beta$ -Oxidation in X-ALD-Mäusen von McGuinness *et al.* (2003) vorgeschlagen. Demnach beruht die Akkumulation von VLCFAs auf Abnormalitäten in den Mitochondrien. Es konnten jedoch keine mitochondrialen Abnormalitäten in *Abcd1* (-/-) Mäusen beobachtet werden (Oezen *et al.*, 2005). Ein weiterer Grund für die Akkumulation von VLCFAs in X-ALD Geweben könnte in der Synthese von

VLCFAs liegen. X-ALD-Zellen weisen eine verstärkte Fettsäure-Elongation auf, die zu den erhöhten Mengen an VLCFAs beitragen könnte (Kemp *et al.*, 2005). Dabei ist nicht klar, wie die Mutation des Transporters in Beziehung zur Fettsäure-Elongation steht. Einigen X-ALD-Patienten wird als diätische Maßnahme „Lorenzos Öl“ gegeben, eine Mischung aus Glycerin-Trioleat und Glycerin-Trioleucat. Hypothetisch könnte die Zufuhr dieser langkettigen, einfach ungesättigten Fettsäuren dazu führen, dass die Enzyme, welche die überlangen Fettsäuren produzieren, kompetitiv gehemmt werden und die Konzentration der Fettsäuren auf ein verträgliches Maß sinkt. Die intensive Suche nach alternativen Therapiemöglichkeiten erbrachte eine Reihe von Substanzen, die die Mengen der sehr langkettigen Fettsäuren in X-ALD-Zellen normalisieren und die zusätzliche Kenntnis, dass die Überexpression von ALDR und PMP70 zu einer normalen  $\beta$ -Oxidation von C24:0 führt (Pahan *et al.*, 1998; Pujol *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 1998; Weinhofer *et al.*, 2002). Damit liegt die Vermutung nahe, dass ALDP, ALDRP und PMP70 überlappende Substratspezifitäten besitzen (Braiterman *et al.*, 1998). Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstrichen, dass ALDRP hohe Sequenzhomologien zu ALDP aufweist (88 % ähnliche und 67 % identische AS) (Pujol *et al.*, 2004; Ferrer *et al.*, 2005).

Eine weitere Rolle von ALDP wird von Yamada *et al.* (1999) vorgeschlagen. Demnach ist ALDP erforderlich für die Lokalisation der ‚very long-chain‘-Acyl-CoA-Synthetase (VLACS) in den Peroxisomen. In *Abcd1* (-/-) Mäusen war die Menge an VLACS-Protein jedoch nur zu 30 % reduziert. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass ALDP nicht am Transport oder der Stabilisierung der VLACS beteiligt ist (Steinberg *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000). Obwohl VLCFAs sowohl im Zytosol als auch in der peroxisomalen Matrix aktiviert werden können, zeigen Studien an *Vlacs* (-/-) Mäusen, dass die in der peroxisomalen Matrix lokalisierten VLACS nicht zur  $\beta$ -Oxidation von VLCFAs beitragen (Heinzer *et al.*, 2003). Damit kann von einer Aktivierung der Fettsäuren im Zytosol ausgegangen werden. Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von VLACS die  $\beta$ -Oxidation in X-ALD-Zellen erhöht (Heinzer *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Peroxisomen eine ausgeprägte VLCFA-CoA-Synthetaseaktivität besitzen, wobei 95 % auf zytosolischer Seite lokalisiert ist (Lageweg *et al.*, 1991). Welche der verschiedenen Acyl-CoA-Synthetasen die Aktivierung der Fettsäuren katalysiert, ist bisher nicht beschrieben.

Zur physiologischen Rolle der ABC-Transporter PMP70 und PMP69 ist nicht viel bekannt. Untersuchungen zeigten, dass PMP70 in den Transport von langkettigen Fettsäuren in die peroxisomale Matrix involviert ist (Imanaka *et al.*, 1999). Durch Studien an PMP70

„knockout“-Mäusen sind 2-Methyl-Acyl-CoA-Ester als zusätzliches Substrat identifiziert worden (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2000). Gegenwärtig gibt es jedoch keine Informationen über die Funktion von PMP69.

#### 1.4.2 Peroxisomale ABC-Transporter aus *Saccharomyces cerevisiae*

Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten, deren  $\beta$ -Oxidation sowohl auf Peroxisomen als auch auf Mitochondrien verteilt ist, findet die  $\beta$ -Oxidation in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ausschließlich in den Peroxisomen statt. Darüber hinaus sind Hefen in der Lage, auf Fettsäuren als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Für dieses auf Fettsäuren basierendes Wachstum sind funktionelle Peroxisomen notwendig, wohingegen diese Organellen für ein Wachstum auf Glukosemedium nicht benötigt werden (Erdmann *et al.*, 1989). Die Suche nach Hefezellen, die nicht mehr in der Lage sind, auf fettsäurehaltigen Medien zu wachsen und somit eine Mutation in Genen tragen, die für die Funktion von Peroxisomen essentiell sind, führte zur Identifizierung zahlreicher peroxisomaler Proteine (Erdmann *et al.*, 1989; Subramani, 1998). Dabei handelt es sich zum einen um die *fox*-Mutanten („fatty acid oxidation“), die einen Defekt in einem Enzym der  $\beta$ -Oxidation besitzen und zum anderen um die *pex*-Mutanten („peroxisome assembly“), die aufgrund ihrer peroxisomalen Biogenese Störung nicht mehr über funktionelle Peroxisomen verfügen oder deren Matrixproteine fehllokalisiert vorliegen (Distel *et al.*, 1996).

Die Funktion der peroxisomalen ABC-Transporter ist in *S. cerevisiae* verhältnismäßig gut verstanden. Die Hefe enthält zwei ALDP Homologe: Pxa1p (peroxisomaler ABC-Transporter 1) auch bekannt als Pat2p oder Pal1p und Pxa2p oder auch Pat1p genannt (Shani *et al.*, 1995; Swartzman *et al.*, 1996; Hetteema *et al.*, 1996). Pxa1p ist als erstes von Shanie *et al.* (1995) identifiziert worden. Dazu wurde RNA aus Ölsäure-induzierten Hefezellen isoliert und diese als Matrize für eine anschließende PCR-Reaktion benutzt. Mit Hilfe von degenerierten Primern, die von dem Walker A- und Walker B-Motiv aus menschlichen peroxisomalen Transportern (ALDP und PMP70) abgeleitet wurden, konnte *PXA1* amplifiziert werden. *PXA1* zeigte die höchsten Sequenzähnlichkeiten zu den menschlichen Genen die für ALDP und PMP70 kodieren und zu einem Hefe-Gen *PXA2*, welches bereits durch ein früheres Hefegenom-Sequenzierungsprojekt identifiziert worden war (Bossier *et al.*, 1994). Eine Deletion des *PXA1*- bzw. *PXA2*-Gens bewirkt ein beeinträchtigtes Wachstum auf Ölsäurehaltigen Agarplatten und eine verminderte  $\beta$ -Oxidationsrate von 18:1. Der Doppelknockout zeigte denselben Phänotyp. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass die von *PXA1*

und *PXA2* kodierten Proteine Untereinheiten ein und desselben Transporters sind (Shanie *et al.*, 1995). Studien verschiedener Arbeitsgruppen bestätigten diese Annahme: Pxa1p und Pxa2p sind integrale Membranproteine, die durch Heterodimerisation einen funktionellen Transporter ausbilden (Hetteema *et al.*, 1996; Shani *et al.*, 1996; Swartzman *et al.*, 1996). Wie bereits erwähnt, funktioniert die  $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren wie 18:1 und 16:0 nur unzureichend in *pxa1* $\Delta$  und *pxa2* $\Delta$  Zellen. Werden diese Zellen jedoch homogenisiert, ist kein Defekt der  $\beta$ -Oxidation mehr messbar, was darauf schließen lässt, das Pxa1p/Pxa2p am Transport von Fettsäuren bzw. deren Acyl-CoA-Ester über die peroxisomale Membran beteiligt ist (Hetteema *et al.*, 1996).

Interessanterweise wiesen die Einzelmutanten *pxa1* $\Delta$  und *pxa2* $\Delta$  und die entsprechende Doppelmutante keinen Wachstumsphänotyp auf Medium mit Laurat (C12:0) und Myristat (C14:0) als Kohlenstoffquelle auf. Die Oxidation dieser Fettsäuren war nahezu normal. Der Fettsäuretransport über die peroxisomale Membran könnte somit über zwei unabhängige Wege ablaufen: einem Weg für langkettige und einem Weg für mittelkettige Fettsäuren. Es ist als sicher anzunehmen, dass langkettige Fettsäuren außerhalb der Peroxisomen aktiviert werden und damit Acyl-CoA-Ester als Substrat für den Pat1p/Pat2p-Transporter fungieren (Johnson *et al.*, 1994). Mittelkettige freie Fettsäuren passieren die Peroxisomenmembran entweder über Diffusion oder proteinvermittelt und werden anschließend von der peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetase Faa2p aktiviert. Van Roermund *et al.* (2000) konnten zeigen, dass das peroxisomale Membranprotein Pex11p aus *S. cerevisiae* in den Abbau von mittelkettigen Fettsäuren involviert ist. Nachfolgende Untersuchungen an *PEX11* $\beta$  Knockout-Mäusen konnten jedoch diese Hypothese nicht bestätigen (Li und Gould, 2002).

Das Fettsäure-Importmodell (Abb. 4 B) wurde durch weitere Experimente von Hetteema *et al.* (1996) untermauert. Das peroxisomale Faa2p wurde dazu, im Hintergrund der *faa2* $\Delta$  bzw. *faa2* $\Delta$  *pat1* $\Delta$  Mutante, ins Zytosol geleitet. Die gemessene  $\beta$ -Oxidationsaktivität gegenüber Laurat (C12:0) zeigte, dass mittelkettige Fettsäuren durch das fehlgeleitete Faa2p im Zytosol aktiviert werden und der weitere Transport von C12:0-CoA in die Peroxisomen Pxa1p/Pxa2p abhängig wurde. Damit bestimmt der Ort der Aktivierung der Fettsäuren (Zytosol oder Peroxisom) den Transportweg.

### 1.4.3 Pflanzliche peroxisomale ABC-Transporter

*A. thaliana* besitzt mehr als 100 ABC-Transporter (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Die ungewöhnlich hohe Anzahl von ABC Transportergenen wird zum Teil durch die während der Evolution des *A. thaliana*-Genoms stattgefundenen Polyploidisation erklärt (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Diese beruht auf einer Duplikation eines Gens oder vollständiger chromosomaler Segmente und erklärt die hohe Homologie unterschiedlicher Gene innerhalb eines Genoms.

Von den genannten ABC-Transportern gehören aber nur zwei zur ABCD Subfamilie: *AtPMP1* (At1g54350) und *AtPMP2* (At4g39850) (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). *AtPMP1* kodiert für ein Halbtransporter-Protein das aus einer Transmembrandomäne und einer Nukleotidbindedomäne besteht. Untersuchungen der Peptidsequenz zeigen, dass das von *AtPMP1* kodierte Protein ein mögliches Chloroplasten Import-Signal enthält. Die Ähnlichkeit zwischen den beiden Proteinen (21 %) ist geringer, als die von *AtPMP2* zu Homologen aus *S. cerevisiae* (24-30 %) und Säugern (36-45 %). *AtPMP2* wurde unabhängig von drei verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert, daher wurden für dasselbe Protein drei unterschiedliche Namen vergeben: *PXA1* (Zolman *et al.*, 2001), *PED3* (Hayashi *et al.*, 2002) und *CTS* (Footitt *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu den beschriebenen Transportern aus Hefe und Säugern kodiert das *PXA1/PED3/CTS*-Gen für einen Volltransporter (1338 AS), wobei die zwei Hälften dieses Transporters (1-679 und 680-1338) signifikante Ähnlichkeiten zu den menschlichen ABCDs (45 % Identität mit PMP70 und 42 % mit ALDR und ALDP und 36 % mit PMP69) aufweisen. Die *ped3*- und die *pxa1*-Mutanten wurden in einem Screen auf Resistenz gegen die Auxinvorstufen 2,4-Dichlorphenoxybutyrat (2,4 DB) und Indol-3-butyratsäure (IBA) identifiziert (Hayashi *et al.*, 2002; Zolman *et al.*, 2001, Hayashi *et al.*, 1998; Zolman *et al.*, 2000). Bei diesem Test wurde sich die Tatsache zu nutze gemacht, dass zu hohe Auxin-Konzentrationen das Streckungswachstum der Wurzel hemmen. In nicht mutagenisierten Pflanzen wurden die genannten Auxinvorläufermoleküle durch die  $\beta$ -Oxidation in den Peroxisomen um zwei Kohlenstoffatome verkürzt, so dass das synthetische Auxin 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) bzw. das natürliche Auxin Indol-3-Essigsäure (IAA) entstanden (Abb. 2 B). Diese Umwandlung bewirkte einen Wachstumsstopp der Wurzel. Die Mutanten *ped3* und *pxa1* reagierten jedoch nicht auf die Auxinvorstufen, was darauf schließen lässt, dass die  $\beta$ -Oxidation unterbrochen ist und daher 2,4 D bzw. IAA nicht gebildet werden konnte. Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, spielt die  $\beta$ -Oxidation eine essentielle Rolle während der Lipidmobilisierung im keimenden Samen. Durch die

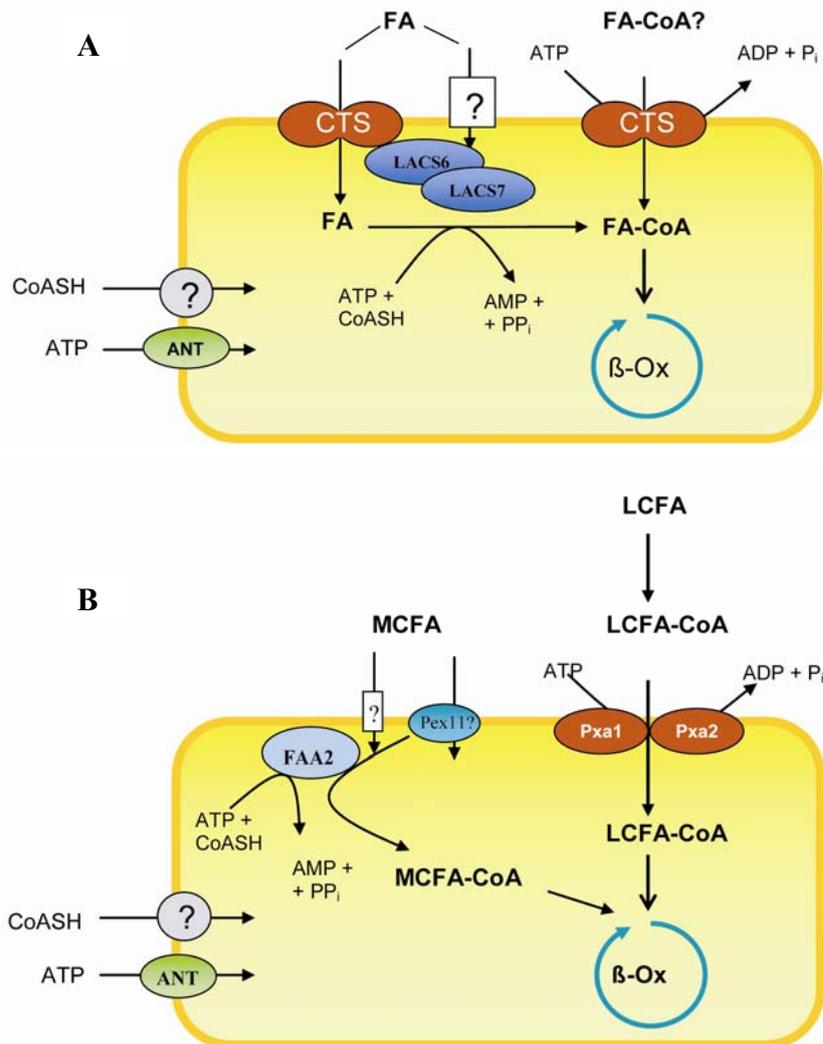
Umwandlung der Speicherlipide in Glukose ist der Keimling in der Lage sich zu etablieren. In Übereinstimmung mit dieser Funktion benötigen *ped3*- und *pxa1*-Mutanten exogen zugeführte Saccharose zu ihrem Wachstum. Das bedeutet, dass diese Mutanten unter natürlichen Bedingungen nicht lebensfähig sind. In späteren Entwicklungsstadien wachsen *pxa1*-Mutanten verlangsamt im Vergleich zu Kontrollpflanzen, mit kleineren Rosetten, weniger Blättern und kürzeren Blütenständen. Dieser Phänotyp zeigt, dass PXA1 auch in späteren Wachstumsphasen eine wichtige Funktion hat. Die *cts1*-Mutante wurde in einem Keimungstest entdeckt (Footitt *et al.*, 2002, (Russell *et al.*, 2000). Mutagenisierte Samen wurden dazu auf ihre Fähigkeit zu keimen überprüft. Die *cts1*-Mutante konnte trotz Ergänzung des Wachstumsmediums mit Saccharose nicht keimen. Nur ein Öffnen der Samenschale ermöglicht das Brechen der Dormanz und damit das Keimen und die nachfolgende Etablierung des Keimlings. Die Analyse des *cts1*-Lokus ergab eine chromosomale Translokation an der Position, die für die Aminosäure an Position 616 kodiert. Ein zweites Allel, *cts2*, enthält eine T-DNA-Insertion ebenfalls in der ersten Hälfte des Transporters (an der Position, die für die Aminosäure 117 kodiert) und offenbart einen sehr ähnlichen Phänotyp (Footitt *et al.*, 2002). In Analogie zu *ped3*- und *pxa1*-Mutanten können *cts1*- und *cts2*-Mutanten nur in der Gegenwart von Zucker-haltigem Medium sich als Keimlinge etablieren. Nach dem späteren Transfer auf Erde sind die *cts*-Mutanten kaum von den Kontrollpflanzen zu unterscheiden. Damit unterscheidet sich der Phänotyp der *cts1*- bzw. *cts2*-Mutanten von dem beobachteten *pxa1*-Phänotyp. Darüber hinaus ist die *pxa1*-Mutante auch ohne exogen zugeführten Zucker in der Lage zu keimen. Da *cts1*- und *cts2*-Samen nur durch Manipulation der Samenschale in der Lage sind zu keimen, wird dem Protein neben der Funktion als Transporter noch eine zweite Funktion bei der Beendigung der Samenruhe zugeschrieben.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Kotyledonen der *cts1*-Mutante zeigten, dass der Abbau der Lipidkörper bis zu 70 % beeinträchtigt ist. Diese eingeschränkte Fähigkeit Reservelipide abzubauen, spiegelt sich auch in der Bestimmung von Fettsäuren und Acyl-CoA-Estern wider (Footitt *et al.*, 2002). Besonders langkettige Acyl-CoA-Ester häuften sich in den Mutanten *cts1* und *cts2* an. Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit dem anderer  $\beta$ -Oxidationsmutanten: *lacs6 lacs7* (‘long-chain’ AcyCoA-Synthetase), *acx1 acx2* (AcyCoA-Oxidase), *kat2* (Thiolase) und *csy2 csy3* (peroxisomale Citrat-Synthase) (Übersicht: Theodoulou *et al.*, 2006). Die Akkumulation der Acyl-CoAs in der *cts1*- und *cts2*- bzw. der *lacs6 lacs7*-Doppelmutante hat keinen Einfluss auf die Morphologie der Peroxisomen, jedoch im Stoffwechselweg nachfolgende Mutanten zeigen eine Vergrößerung und Verzerrung der

Form der Peroxisomen. Diese Veränderung der Peroxisomen wird mit einer Anhäufung von CoA-Estern in den Peroxisomen gedeutet. Für die *cts-* bzw. *lacs6 lacs7*-Mutanten wird hingegen eine Aktivierung der Fettsäuren im Zytosol durch eine zytoplasmatische LACS postuliert. In *A. thaliana* sind neun Mitglieder der LACS Familie beschrieben worden, wobei nur LACS6 und LACS7 in der peroxisomalen Matrix lokalisiert sind (Shockey *et al.*, 2002).

Aufgrund der Anhäufung der Fettsäuren und Acyl-CoA-Ester in der *cts*-Mutante und der Tatsache das *PXA1* für ein integrales Membranprotein kodiert, werden Fettsäuren, CoA-Ester oder möglicherweise auch Kofaktoren für die  $\beta$ -Oxidation als Substrat für den Transporter angenommen. Es wäre auch denkbar, das *PXA1* einen anderen Transporter oder Enzyme, die in den Abbau von Fettsäuren involviert sind, reguliert. Fulda *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die Aktivierung der Fettsäuren durch LACS6 oder LACS7 in den Peroxisomen essentiell für die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren ist. Deletionsmutanten von *LACS6* oder *LACS7* wiesen keinen sichtbaren Phänotyp auf. Durch Kreuzung beider Mutanten wurde eine Doppelmutante erzeugt, die keine peroxisomale LACS-Aktivität mehr aufweist. Diese *lacs6 lacs7*-Mutante entwickelt weder eine Wurzel, noch grüne Blätter und ist unter natürlichen Bedingungen nicht lebensfähig. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kotyledonen im frühen Keimlingsstadium der Doppelmutante zeigten, dass die Ölkörper zu einem großen Prozentsatz noch vorhanden sind (Fulda *et al.*, 2004). Die Mobilisierung der Speicherlipide erfolgt somit nur zu einem ganz geringen Teil, der nicht ausreicht, den Keimling mit erforderlichen Mengen an Kohlenstoffgerüsten zu versorgen. Die Aktivierung von Fettsäuren in den Peroxisomen ist demnach essentiell für den Keimling. In Analogie zu *ped3* und *pxa1*, lässt sich die beschriebene Blockade in der Keimlingsentwicklung durch Ergänzung des Wachstumsmediums mit Saccharose überwinden. Damit wurde bewiesen, dass Keimlinge von *A. thaliana* sowohl auf die peroxisomale LACS-Aktivität, als auch auf die Aktivität des *PXA1*-Transporters angewiesen sind. Es bleibt bislang unklar, ob LACS direkt in den Transport von Fettsäuren involviert sind oder bereits in die peroxisomale Matrix transportierte Fettsäuren als Substrat der LACS fungieren. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen peroxisomalen LACS und *PXA1* für den Import der Fettsäuren notwendig sind. Sollte der *PXA1*-Transporter freie Fettsäuren transportieren, so wäre eine anschließende Aktivierung dieser durch die LACS-Proteine essentiell. Alternativ wäre auch denkbar, dass *PXA1* und *LACS6/LACS7* an zwei parallelen Abbauwegen beteiligt sind (Abb. 4 A), wobei der Transporter aktivierte Fettsäuren translozieren würde, während parallel freie Fettsäuren über Diffusion oder einen weiteren Transporter in die Peroxisomen gelangen und von *LACS6/LACS7* aktiviert werden. Als zusätzliche Erschwernis für das

Verständnis der Fettsäuredegradation in *A. thaliana* hat sich die verbliebene Fähigkeit der *lacs6 lacs7*-Doppelmutante zu einem verzögerten Fettsäureabbau während der Keimlingsentwicklung auf Medium mit Saccharose erwiesen (Fulda *et al.*, 2004).



**Abb. 4: Modelle zum Fettsäuretransport in Glyoxysomen von *A. thaliana* und *S. cerevisiae* (Theodoulou *et al.*, 2006)** **A:** *A. thaliana*: Der in der peroxisomalen Membran lokalisierte PXA1-Transporter ist am Transport von Fettsäuren beteiligt. Es ist dabei nicht eindeutig geklärt, ob aktivierte oder freie Fettsäuren als Substrat fungieren. Die in die peroxisomale Matrix gelangten freien Fettsäuren werden durch LACS6 oder LACS7 zu Thioestern aktiviert. Aufgrund der Veresterung mit CoA ist der Import irreversibel. Die aktivierten Fettsäuren stehen damit der β-Oxidation zur Verfügung. Die beiden Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 und LACS7 benötigen für ihre Funktion ATP und CoA. **B:** *S. cerevisiae*: Der Transportweg der Fettsäuren über die peroxisomale Matrix ist in Hefe abhängig von der Kettenlänge der Fettsäuren. Langkettige Fettsäuren werden im Zytosol von Acyl-CoA-Synthetasen aktiviert und anschließend als Acyl-CoA-Ester von Pxa1p/Pxa2p in die peroxisomale Matrix transportiert. Mittelkettige Fettsäuren passieren die peroxisomale Membran durch einfache Diffusion oder einen weiteren Transporter (Pex11?). Diese mittelkettigen Fettsäuren werden von der peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetase FAA2 aktiviert. FAA2 benötigt ebenfalls ATP und CoA. Ein CoA-Transporter ist für Hefe bisher nicht beschrieben worden, jedoch das für den ATP-Transport verantwortliche Ant1-Protein.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieses Projektes sollte der Mechanismus des Fettsäureimports in pflanzliche Peroxisomen untersucht werden. Im Mittelpunkt stand dabei die Rolle des membranintegralen ABC-Transporters PXA1 und dessen Interaktion mit den beiden peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 und LACS7. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Mutanten *pxa1-2* und *lacs6 lacs7* in Gegenwart von Zucker im Wachstumsmedium zu einem stark verlangsamten Abbau von Reservelipiden in der Lage sind. Es sollte in dieser Studie geklärt werden, ob diese verbliebene Fähigkeit zur  $\beta$ -Oxidation auf komplementierende Wirkung zwischen peroxisomalen LACS und PXA1 zurückzuführen ist oder einer  $\beta$ -Oxidations-unabhängigen Stoffwechselfunktion zuzuordnen ist. Für ein besseres Verständnis des Transportprozesses sollte bestimmt werden, ob Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen peroxisomalen LACS1 und dem ABC-Transporter für den Import der Fettsäuren essentiell sind. Darüber hinaus sollten neue Erkenntnisse über die gewebespezifische Expression von PXA1 und LACS gewonnen werden. Zusätzlich sollten Hinweise zur Substratspezifität des PXA1-Transporters durch Transportversuche mit isolierten Peroxisomen bzw. Liposomen erhalten werden.

Aufgrund des beschriebenen unterschiedlichen Keimungsverhaltens verschiedener PXA1-Transportermutanten, sollte eine Keimungsanalyse zeigen, ob das Keimungspotential abhängig von der Lage der Mutation innerhalb des Gens ist.

Es ist bisher davon auszugehen, dass der Fettsäureimport in *A. thaliana* einem anderen Mechanismus zu Grunde liegt, als in *S. cerevisiae*. Untersuchungen der peroxisomalen Acyl-CoA-Synthasen Faa2p und Fat2p sollten zeigen, ob sich die für die  $\beta$ -Oxidation notwendige Aktivierung der Fettsäuren zwischen Pflanze und Hefe unterscheidet oder ob ähnliche Wirkungsweisen vorliegen.

## Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Soweit nicht anderes vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fermentas (St.Leon-Rot), Acros Organics (Geel, Belgien), Amersham Bioscience (Freiburg) und Macherey-Nagel (Düren) bezogen.

### 2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht

#### 2.2.1 *A. thaliana*

Neben den Ökotypen Wassilewskija (WS) und Columbia (Col-0) wurden folgende Mutanten-Linien verwendet:

**Tabelle 1. Beschreibung der verwendeten *A. thaliana* -Mutanten**

Protein	AGI Code	Allel	Mutagen	Ökotyp	Referenz
COMATOSE ABC-Transporter	At4g39850	<i>cts-1</i>	schnelle Neutronen, Translokation	Landsberg <i>erecta (Ler)</i>	Russell <i>et al.</i> , 2000
COMATOSE ABC-Transporter	At4g39850	<i>cts-2</i>	T-DNA- Insertion	WS	Footitt <i>et al.</i> , 2002
COMATOSE ABC-Transporter	At4g39850	<i>pxa1-2</i>	T-DNA- Insertion	Col-0	Fulda <i>et al.</i> , 2004
Thiolase	At2g33150	<i>kat2-1</i>	T-DNA- Insertion	WS	Germain <i>et al.</i> , 2001
LACS6 / LACS7	At3g05970 At5g27600	<i>lacs6-1 lacs7-1</i>	T-DNA- Insertionen	WS	Fulda <i>et al.</i> , 2004
LACS6 / LACS7 / PXA	At3g05970 At5g27600 At4g39850	<i>lacs6-1 lacs7-1- pxa1-2</i>	T-DNA- Insertionen	Hybrid WS/Col-0	diese Arbeit

### 2.2.2 Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Saatgut

Für die Anzucht von *A. thaliana* auf MS-Medium wurden oberflächensterilisierte Samen verwendet. Zu 10-80 mg Samen wurde 1 ml 70 %-iger Ethanol (v/v) hinzugegeben und für 1 min langsam geschwenkt. Nach dem Absinken der Samen wurde das Ethanol abgenommen und die Samen in 1 %-iger Natriumhypochloritlösung mit 0,1 % Triton X-100 (v/v) für 20 min schwenkend inkubiert. Danach wurden die Samen 4-6-mal in sterilem A. dest. gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Saatgut in 0,1 %-igen Agar (w/v) bzw. sterilem A. dest. aufgenommen und bei 4 °C für mindestens 2 Tage inkubiert. Dieses Vorgehen dient dem Brechen der Dormanz und um eine gleichmäßige Keimung zu erzielen.

### 2.2.3 Anzucht von *A. thaliana* auf MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962)

4,3 g/l (1x MS) bzw. 2.2 g/l (1/2x MS) MS-Mischung (Duchefa, Haarlem, Niederlande) und 7 g/l Mikroagar wurden mit destilliertem Wasser versetzt. Alternativ wurde entweder 0,5 %, 1 % bzw. keine Saccharose (w/v) hinzugefügt. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit KOH auf 5.9 eingestellt. Für eine Selektion transgener Pflanzen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von ca. 60 °C zusätzlich Hygromycin B (35 mg/ml) bzw. Glufosinat-Ammonium (12 µg/ml) zugefügt. Oberflächensterilisiertes und stratifiziertes Saatgut (2.2.2) wurde auf MS-Platten verteilt und für ca. 2 Wochen bei 23 °C unter Dauerlicht angezogen (120 µmol/m<sup>2</sup>s Licht).

### 2.2.4 Anzucht von *A. thaliana* auf Erde

Für die Anzucht von *A. thaliana* in den Klimakammern wurde entweder unsteriles Saatgut direkt auf Erde ausgelegt oder etablierte Keimlinge von MS-Platten auf Erde (EP Nr. 340 Fruhstorfer Erde, Firma Industrie-Erdenwerk Archut, Lauterbach-Wallenrad) umgesetzt. Es wurde die Erde Typ verwendet. Vor Gebrauch wurde die Erde durch 6-stündiges Erhitzen auf 80 °C keimarm gemacht. Die Pflanzen wurden zunächst unter Kurztagsbedingungen (8 h 120 µmol/m<sup>2</sup>s Licht, 60 % Feuchte, 22 °C) angezogen. Dadurch entwickeln die Pflanzen eine größere Blattmasse und die Blühinduktion setzt später ein. Keimlinge, die von MS-Platten auf Erde umgesetzt wurden, waren durch diese Behandlung stark gestresst und bildeten zum Teil Stressblüten, die jedoch zurückgeschnitten wurden. Nach ca. 3 Wochen wurden die Pflanzen

dann unter Langtagsbedingungen (16 h 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  Licht, 60 % Feuchte, 22 °C) bis zur Samenreife angezogen.

### 2.2.5 *Ricinus communis*

Keimlinge von *R. communis* wurden für die Isolation von Glyoxysomen verwendet. Das erforderliche Saatgut („Zanzibarensis Gemischt“) wurde von der Firma Benary aus Hann. Münden bezogen. Die Samen wurden für 10 min in 1 %-iger Natriumhypochloritlösung oberflächensterilisiert. Die anschließende Quellung erfolgte unter mehrfachem Wechsel des Wassers (Leitungswasser) für ca. 24 h bei Raumtemperatur. Die Samen wurden in einer Pflanzschale auf angefeuchtetes Haushaltspapier ausgebreitet und für 4-6 Tage bei 30 °C abgedunkelt zur Keimung gebracht (Vigil *et al.*, 1987). Im Anschluss erfolgte die Isolierung der Glyoxysomen (2.22.2).

## 2.3 Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2. Verwendete Bakterienstämme**

Stamm/Referenz	Beschreibung	Verwendung
<b><i>E. coli</i> XL1-Blue</b> (Bullock <i>et al.</i> , 1987)	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lac <sup>q</sup> , lacZ <sup>-</sup> $\Delta$ M15, Tn10 (tet <sup>r</sup> )]	Klonierungsarbeiten
<b><i>E. coli</i> Rossetta (DE3)pLysS</b> (Novagen)	F <sup>o</sup> ompT hsd S <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> ) gal dcm lacY1 (DE3) pLys SRARE (Cm <sup>R</sup> )	Expression von Proteinen
<b><i>E. coli</i> K27 (<i>fadD</i>)</b> (Fulda <i>et al.</i> , 2002)	<i>E. coli</i> K27 ( <i>fadD</i> ) von Overath <i>et al.</i> , 1969, zusätzliche Integration der T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des T7lacUV5-Promotors	Expression von Fat2

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen erfolgte über Nacht bei 37 °C auf LB Festmedium oder in LB- bzw. SOB-Flüssigmedium, welches bei 220 rpm geschüttelt wurde. Die Kultivierung von *A. tumefaciens* erfolgte in YEB-Medium bei 28 °C für mindestens 48 h. Flüssigkulturen wurden ebenfalls bei 220 rpm geschüttelt.

<b>LB-Medium</b> (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml A. dest., pH 7,5 mit NaOH  einstellen
<b>SOB-Medium</b>	10 g Pepton 2,5 g Hefeextrakt 0,3 g NaCl 0,09 g KCl ad 498 ml A. dest., nach dem Autoklavieren steril
zugeben:	1 ml 1M MgSO <sub>4</sub> 1 ml 1M MgCl <sub>2</sub>
<b>YEB-Medium</b>	0,5 % Rinderextrakt (w/v) 0,1 % Hefeextrakt (w/v) 0,5 % Peptone (w/v) 0,5 % Glukose (w/v) 2 mM MgSO <sub>4</sub>

Festmedien enthielten 15 g Agar pro Liter Medium.

Wenn Antibiotika erforderlich waren, wurden diese dem Medium in folgender Menge zugesetzt:

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration
Carbenicillin (Carb)	100 mg/ml in A. dest.	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	30 mg/ml in A. dest.	30 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	12,5 mg/ml in Ethanol	12,5 µg/ml
Rifampicin (Rif)	50 mg/ml in Methanol	50 µg/ml

Für  $\beta$ -Galaktosidase-Selektion (Blau-Weiß-‘Screening’) wurden den Festmedien Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktosid (IPTG) als Induktor und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal) zugesetzt.

**IPTG-Lösung**                      Stammlösung: 100 mM IPTG in A. dest., bei -20 °C gelagert  
Endkonzentration: 200 µM

**X-Gal-Lösung**                      Stammlösung: 2 % (w/v) X-Gal in Dimethylformamid, bei  
-20 °C gelagert  
Endkonzentration: 80 µg/ml

## 2.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Alle verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme sind in Tabelle 3 aufgezeigt.

**Tabelle 3: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme.**

Stamm	Genotype	Referenz
YB332	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3<math>\Delta</math>200, ade2-101, lys2-801, leu2</i>	(Knoll <i>et al.</i> , 1995)
YB485	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3<math>\Delta</math>200, ade2-101, lys2-801, leu2, faa2<math>\Delta</math>::LEU2</i>	Knoll <i>et al.</i> , 1995
BY4741	<i>MATa; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; pat1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
AS1	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3<math>\Delta</math>200, ade2-101, lys2-801, leu2, faa2<math>\Delta</math>::LEU2, pat1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	diese Arbeit
AS2	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3<math>\Delta</math>200, ade2-101, lys2-801,</i>	diese Arbeit

	<i>leu2, pat1Δ::kanMX4</i>	
AS3	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3Δ200, ade2-101, lys2-801, leu2, pat1Δ::kanMX4, Δfat1::clonNAT</i>	diese Arbeit
AS4	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3Δ200, ade2-101, lys2-801, leu2, faa2Δ::LEU2, fat1Δ::clonNAT</i>	diese Arbeit
AS5	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3Δ200, ade2-101, lys2-801, leu2, pat1Δ::kanMX4, fat2Δ::clonNAT</i>	diese Arbeit
AS6	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3Δ200, ade2-101, lys2-801, leu2, fat2Δ::clonNAT, faa2Δ::kanMX4</i>	diese Arbeit
AS7	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3Δ200, ade2-101, lys2-801, leu2, fat1Δ::kanMX, fat2Δ::hygMX4</i>	diese Arbeit
AS8	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3Δ200, ade2-101, lys2-801, leu2, fat1Δ::kanMX</i>	diese Arbeit
AS9	<i>MATa NMT1 ura3-52, his3Δ200, ade2-101, lys2-801, leu2, fat2Δ::hygMX4</i>	diese Arbeit
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YJR019c::kanMX4</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998

Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden bei 30 °C je nach Anwendung in unterschiedlichen Medien angezogen.

#### YEPD

2 % Pepton (w/v)

1 % Hefeextrakt (w/v)

2 % Glukose (w/v)

#### SD-Medium

1,7 g Yeast Nitrogen Base (Bio 101<sup>®</sup>Systems, Heidelberg)

5 g Ammoniumsulfat

ad 950 ml A. dest.,

nach dem Autoklavieren steril zugeben:

erforderliche L-Aminosäuren wurden entsprechend Sherman *et al.* (1986) zugesetzt

2 % Glukose (w/v)

alternativ: 2 % Raffinose oder 2 % Galaktose (w/v)

Dem SD-Medium wurden zur Selektion der Transformanten folgende Antibiotika zugesetzt:

**Hygromycin B (Hyg)** Stammlösung: 300 mg/ml in A. dest.  
Endkonzentration im Medium: 300 µg/ml

**Nourseothricin (clonNAT)** Stammlösung: 100 mg/ml in A. dest.  
Endkonzentration im Medium: 100 µg/ml

**Geneticin (G418)** Stammlösung: 300 mg/ml in A. dest.  
Endkonzentration im Medium: 300 µg/ml

### Medium für Tropftests

a) Flüssigmedium

- 0,85 g Yeast Nitrogen Base (YNB)
- 0,5 g Hefeextrakt
- 2,5 g Ammoniumsulfat
- ad 490 ml A.dest., pH 6,0

nach dem Autoklavieren:

- 0,3 % Glukose (w/v)
- erforderliche L-Aminosäuren wurden
- entsprechend Sherman *et al.* (1986) zugesetzt

b) Festmedium

- 0,85 g YNB
- 0,5 g Hefeextrakt
- 2,5 g Ammoniumsulfat
- 10 g Mikroagar
- 0,1 % Ölsäure (techn. 90 %, Sigma) gelöst in 0,25 %
- Tween 80 (Roth, Karlsruhe)
- ad 495 ml A.dest., pH 6,0

nach dem Autoklavieren:

- erforderliche L-Aminosäuren wurden
- entsprechend Sherman *et al.* (1986) zugesetzt

## 2.5 Klonierungstechniken

### 2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki *et al.*, 1985)

Mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase wurden während der Polymerasekettenreaktion DNA-Fragmente amplifiziert. Es wurden dabei Zyklen eines Temperaturprofils durchlaufen, welches die folgenden Schritte beinhaltet: Denaturierung, ‚Annealing‘ (Primerhybridisierung) und Polymerisation. Als Startpunkt für die DNA-Synthese dienten zwei einzelsträngige Oligonukleotide, die zu jeweils einem Strang der Ziel-DNA komplementär und gleichzeitig gegenläufig konstruiert waren. In einem gepufferten Reaktionsansatz konnte mit Hilfe dieser Oligonukleotide in Gegenwart von dNTPs und einer DNA-Polymerase der DNA-Bereich zwischen den Primerbindungsstellen amplifiziert werden. Der Einsatz einer bestimmten DNA-Polymerase richtete sich danach, wie hoch die Fehlerrate des DNA-Amplifikats sein konnte. Die verwendeten DNA-Polymerasen verfügten über eine unterschiedliche Korrekturlese-Funktion (‚proof reading‘) gegenüber der replizierten DNA.

Die für die PCR notwendigen Komponenten wurden in einem Ansatz vereinigt und das PCR-Programm unter Verwendung eines Thermocyclers (Eppendorf) gestartet.

<b>‘proof reading’-Polymerasen:</b>  (niedrige Fehlerrate)	PfuUltra™High-Fidelity-PCR-System (Stratagene, La Jolla, USA), Phusion™ High-Fidelity PCR Kit (Finnzymes, Espoo, Finnland)
<b>‘non-proofreading’-Polymerasen</b> (hohe Fehlerrate)	Expand™ High Fidelity PCR-System (Roche, Grenzbach) Takara Ex Taq™ DNA Polymerase (TAKARA BIO) Tfl-Polymerase™ (Biozym, Hess. Oldendorf)

<b>Standardansatz PCR (50µl):</b>	genomische DNA	1 µl (100 ng)
	Ex <i>Taq</i> -Puffer	5 µl (10x)
	Ex <i>Taq</i> -Polymerase	0,3 µl
	‘forward’ Primer	1 µl (100µM)
	‘reverse’ Primer	1 µl (100µM)
	dNTPs	4 µl
	H <sub>2</sub> O	38,7 µl

### Allgemeines PCR-Programm:

Denaturierung	94 °C	3 min	} 36 Zyklen
Denaturierung	94 °C	0,5 min	
„Annealing“	46-64 °C	0,5 min	
Polymerisation	72 °C	1 min/kb	
Auffüllreaktion	72 °C	5 min	
	4 °C	halten	

### 2.5.2 Restriktionsverdau (Sambrook *et al.* 1989)

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA sequenzspezifisch durch Hydrolyse kovalenter Bindungen. Dabei werden 4-8 bp lange palindromische Sequenzen erkannt und geschnitten.

Für analytische Restriktionsreaktionen wurden ca. 0,5 µg DNA mit 1-2 „Units“ Restriktionsenzym (Firma MBI Fermentas, St.Leon-Rot) in einem Volumen von 20 µl bei 37 °C für 1 h inkubiert. Für die Restriktion präparativer Mengen an DNA wurden entsprechend größere Volumina eingesetzt. Reaktionspuffer wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarosegelen (Seakem<sup>®</sup>LE Agarose, Biozym-Hess. Oldendorf), deren Konzentration sich nach der Größe der erwarteten DNA-Moleküle richtete. Es wurden jedoch hauptsächlich 1 %-ige (w/v) Gele in TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 0,1 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurde noch ein DNA-

Längenstandard (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 1,5 bis 6 V/cm mit 1 x TAE als Laufpuffer in horizontalen Agarosegelkammern. Anschließend wurde das Agarosegel ca. 15 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) inkubiert. Die DNA-Banden konnten somit mittels eines UV-Transilluminators bei 312 nm detektiert werden.

**10 x TAE-Puffer:**                      2 M Tris/HCl  
    1 M Natriumacetat  
    100 mM EDTA pH 8,0

**DNA-Probenpuffer (5x):**              10 mM Tris/HCL  
    20 % (v/v) Glycerin  
    0,1 % (w/v) Bromphenolblau

#### **2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Unter UV-Licht (312 nm) wurde zunächst das DNA-Fragment enthaltende Agarosegelstück mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die weitere Isolierung der DNA erfolgte mittels ‚DNA and Gel Band Purification Kit‘ (Amersham, Freiburg) entsprechend den Angaben des Herstellers.

#### **2.5.5 Dephosphorylierung**

Das Enzym ‚Calf Intestinal Alkaline Phosphatase‘ (CIAP) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) katalysiert die Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden. Durch das Behandeln von bereits verdauten Vektoren mit diesem Enzym wird die Wahrscheinlichkeit der Selbstligation des Vektors während einer Ligasereaktion minimiert. Die Verwendung des Enzyms erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

### 2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Während einer Ligrationsreaktion werden die kohäsiven oder glatten Enden zweier linearer DNA-Fragmente mit Hilfe der T4-DNA-Ligase miteinander verbunden. Dabei werden Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxy-Ende von doppelsträngiger DNA gebildet. Die T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) wurde entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet. Die Ligrationsansätze wurden für ca. 24 h bei RT inkubiert. Die Konzentration an DNA betrug zwischen 1 und 10 ng/μl, das molare Verhältnis von Vektor- und Insert-DNA lag dabei zwischen 1:3 und 1:10.

Für Ligrationsreaktionen von PCR-Fragmenten in den pGEM-T Vektor wurde das pGEM-T-Vektor System II Kit (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

Im Anschluss an die Ligrationsreaktion wurde die DNA ohne weitere Reinigung zur Transformation (2.8.1) eingesetzt.

### 2.6 Verwendete Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4. Auflistung der verwendeten Plasmide mit der entsprechenden Referenz**

Plasmid	Referenz
pGEM-T	Promega
pUG6	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pAG25-ADH	M. Scharnewski, Diplomarbeit, Universität Göttingen
pAG32-CYC	M. Scharnewski, Diplomarbeit, Universität Göttingen
pC1302	CAMBIA, Canberra, Australien
pBI101.3	CLONTECH (Jefferson <i>et al.</i> , 1987a)
pGEM11-L7pro-OCS3term	bereitgestellt von Dr. M. Fulda, Universität Göttingen
pCAT-EYFP	Fulda <i>et al.</i> , 2002
pgMDH-ECFP	Fulda <i>et al.</i> , 2002
pET42c	Novagen, Madison, Wi, USA
pET28a	Novagen, Madison, Wi, USA
pYES2NTC	Invitrogen, Karlsruhe
pRS423prom	Mumberg <i>et al.</i> , 1994
pYORK_YBR222c	Euroscarf; acc. no. P20364

pBeloBAC T5J17	TAIR
H1A6	TAIR

## 2.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von den Firmen Metabion (Martinsried), Invitrogen (Karlsruhe), Biomers (Ulm) und Roth (Karlsruhe) synthetisiert. Sie sind im Anhang gezeigt.

## 2.8 Transformationsmethoden

### 2.8.1 Transformation von *E.coli* (Inoue *et al.*, 1990)

Das Zellwachstum einer 250 ml SOB-Kultur wurde in der exponentiellen Phase ( $OD_{600nm}$  von 0,5) gestoppt, indem sie 10 min auf Eis inkubiert wurden. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 5000 x g bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden erneut 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (5000 x g bei 4 °C). Das Zellpellet wurde nun in 8 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und mit 560 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Für einen Transformationsansatz wurden 200 µl kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurde 1-10 µg Plasmid-DNA (2.5.6) gegeben und der Ansatz für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzschock bei 42 °C für 50 s und eine erneute Inkubation auf Eis für 1 min. Nach Zugabe von 800 µl SOB wurden die Zellen ca. 40 min bei 37 °C inkubiert, was der Etablierung der Plasmide diente. Die Ansätze wurden anschließend auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

<b>TB-Puffer</b> (frisch angesetzt)	10 mM	PIPES (Piperazin-N,N'-bis[2-Ethansulfonsäure])
	55 mM	MnCl <sub>2</sub>
	15 mM	CaCl <sub>2</sub>
	250 mM	KCl

### 2.8.2. Transformation von *S. cerevisiae* (modifiziert nach Ito *et al.*, 1983)

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode, wobei Alkalkationen Hefezellen für die DNA-Aufnahme kompetent machen. Von einer Vorkultur (YEPD) wurden 400 µl zum Animpfen von 10 ml frischen YEPD Medium eingesetzt. Die Kultur wurde für ca. 5-6 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 1800 x g für 5 min wurden die Zellen sedimentiert. Nachdem die Zellen zweimal in A. dest. gewaschen wurden, erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 400 µl LiOAc-TE-Puffer.

200 µl der nun kompetenten Hefezellen wurden mit 20 µl Heringssperma-DNA (vorher 5 min auf 65 °C erhitzt) und der DNA-Probe vermischt. Daraufhin wurde 800 µl PEG in LiOAc-TE hinzugefügt und der Ansatz stark geschüttelt. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C (Probe wurde ab und zu geschwenkt) erfolgte der Hitzschock bei 42 °C für 25 min. Im anschließenden Zentrifugationsschritt wurden die Zellen bei 4500 x g für 30 s sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 ml YEPD resuspendiert und für 1-3 h bei 30 °C schwenkend inkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf Selektionsmedien ausplattiert und für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert.

**LiOAc-TE**                      100 mM C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>LiO<sub>2</sub>  
   10 mM Tris/HCl, pH 7,5  
   1 mM EDTA

**PEG-Lösung**                      40 % (w/v) PEG4000  
   100 mM C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>LiO<sub>2</sub>  
   10 mM Tris/HCl, pH 7,5  
   1 mM EDTA

### 2.8.3 Herstellung von *S. cerevisiae* Deletionsmutanten (Wach *et al.*, 1994)

Die Deletion einzelner Hefegene erfolgte durch homologe Rekombination mit linearen DNA-Fragmenten. Die linearen DNA-Fragmente, die sowohl eine Resistenz-Kassette enthalten, als auch in den flankierenden Bereichen Sequenzen, die eine homologe Rekombination in den zu deletierenden Genlokus erlauben, wurden durch PCR amplifiziert. Dazu wurden ca. 64 Basen lange Oligonukleotide benötigt, bei denen sind 18-19 Basen komplementär zu

Primerbindungsstellen von Plasmiden sind, die für verschiedene Resistenz-Kassetten kodieren. Die weiteren ca. 45 Basen bilden bezüglich der Matrize Überhänge, die spezifisch für die homologe Rekombination in das Hefegenom sind. Als Sequenzbereiche für die homologe Rekombination wurden wie in den etablierten genomweiten Deletionsprojekten jeweils der 5'-Bereich vor dem zu deletierenden Gen einschließlich dem Startkodon gewählt, sowie der 3'-Bereich hinter dem zu deletierenden Gen einschließlich dem Stopkodon. Auf diese Weise wurde der offene Leserahmen des Zielgens komplett deletiert. Das korrekte PCR-Produkt wurde von kompetenten Hefezellen aufgenommen. Die Isolierung erfolgreich transformierter Zellen erfolgte durch Wachstum auf Medium mit Antibiotika. Von den resistenten Transformanten wurde die genomische DNA isoliert (2.9.3) und die Gen-Deletion mittels PCR verifiziert.

#### **2.8.4 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* (Hofgen und Willmitzer, 1988)**

Mit 2 ml einer YEB-Übernachtskultur von *A. tumefaciens*- EHA105-Zellen (Hood *et al.*, 1993) wurde 50 ml YEB-Medium angeimpft. Bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurden die Zellen ca. 5 h bei 28 °C geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert (10 min bei 3500 x g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 10 ml 0,15 M NaCl aufgenommen. Nachdem die Zellen noch zweimal mit 0,15 M NaCl gewaschen wurden, wurde das Sediment in 1 ml eiskalten 75 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Aliquots von je 200 µl kompetenten Zellen wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen in der Hand aufgetaut. Ca. 6 µl Plasmid-DNA wurde zu den Zellen gegeben und der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Kälteschock bei -80 °C für 5 min. Nachdem die Zellen bei 37 °C aufgetaut wurden, wurde 1 ml YEB-Medium hinzugefügt und das Gemisch 4 h bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Damit konnte das für die folgende Selektion notwendige Antibiotikaresistenzgen exprimiert werden. Der Transformationsansatz wurde auf YEB-Platten mit Antibiotikazusatz ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

### 2.8.5 Transformation von *A. thaliana*

Das Prinzip der ‚Floral-Dip‘-Transformationsmethode (Clough und Bent, 1998) beruht darauf, dass mit Hilfe von *A. tumefaciens* Gene, die auf einem binären Vektor kodiert sind, in Pflanzenzellen übertragen werden können. Die so genannte Transfer-DNA, die nur einen Teil des Vektors darstellt, wird über einen noch nicht im Detail verstandenen Mechanismus in den Kern der Pflanzenzelle transportiert und an einer zufälligen Stelle des Chromosoms integriert.

Von einem frisch transformierten Agrobakterienstamm (2.8.4) wurde von einer Kolonie über Nacht eine Kultur in 5 ml YEB-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) angezogen. 4 ml der Vorkultur wurden in 400 ml frischem YEB-Medium verdünnt und für 24 h bei 28 °C schüttelnd bei 220 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden danach 20 min bei 1700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in ca. 200 ml Infiltrationsmedium (5 % Saccharose (w/v), 0,05 % Silwet L-77 (v/v)) resuspendiert.

Die zu transformierenden *A. thaliana*- Pflanzen wurden auf Erde angezogen (2.2.4). Zum Zeitpunkt der Transformation hatte der Blütenstand eine Länge von ca. 6 cm. Für eine Transformation wurden durchschnittlich 30 Pflanzen verwendet. Die Blüten wurden für ca. 2-3 s in die Agrobaktériensuspension getaucht. Anschließend wurden die sich in Töpfen befindenden infiltrierten Pflanzen in eine Pflanzschale gestellt und mit einer Plastikhaube bedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Die Hauben wurden nach einem Tag entfernt und die Pflanzen bis zur Entwicklung reifer Schoten 4-6 Wochen weiter unter Langtagsbedingungen kultiviert. Bei geringer Transformationsrate wurden die Pflanzen nach ca. 2 Wochen nochmals transformiert.

Zur Selektion der transformierten Keimlinge wurde das geerntete Saatgut auf MS-Medium mit Hygromycin (35 mg/l) und 0,5 % Saccharose (w/v) ausgelegt (2.2.3). Die resistenten Keimlinge wurden nach ca. 14 Tagen auf Erde umgesetzt und weiter kultiviert (2.2.4).

### 2.8.6 Kreuzung von *A. thaliana*

Zum Kreuzen wurden von ungeöffneten Knospen der als weiblicher Kreuzungspartner vorgesehenen Pflanze mit Hilfe einer Pinzette alle Blütenorgane mit Ausnahme des Stempels entfernt. Eine geöffnete Blüte des männlichen Kreuzungspartners wurde mit der Pinzette so am Blütengrund gefasst, dass sich die Blüte beim Zusammendrücken der Pinzette weit öffnete. Dadurch standen die Staubgefäße frei nach außen und konnten zum Bestäuben der

Stempel des weiblichen Kreuzungspartners verwendet werden. Nach der Bestäubung wurden die Blüten mit einer Folie umwickelt, die nach 2-3 Tagen wieder entfernt wurde. Bis zur Ernte der Samen wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen weiter kultiviert.

### **2.8.7 Transiente Expression von Proteinen in Zwiebelepidermiszellen (*Allium cepa*)**

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen wurde durch die Transformation von Zwiebelepidermiszellen überprüft. Zwiebelepidermen liegen in einzelligen Schichten vor, die eine einfache mikroskopische Untersuchung erlauben. Es wurde zunächst ein Konstrukt erstellt, indem das zu analysierende Gen C-terminal mit einem EYFP-Gen fusioniert wurde. Für die Markierung von Peroxisomen in doppelt-transformierten Zwiebelepidermiszellen wurde das gMDH-ECFP Konstrukt (Fulda *et al.*, 2002) verwendet. Ca. 5 µg der Fusionskonstrukte wurde an 1.0 µm Goldpartikel (Biorad, Hercules, CA, USA) gebunden. Die Goldpartikel wurden zuvor mit Ethanol gewaschen, zu Einheiten von je 50 µl (50 mg/ml) aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Neben der Plasmid-DNA wurde zu einem Goldpartikelansatz 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> und 20 µl 0,1 M Spermidin zugegeben. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 s wurde der Überstand abgenommen, die pelletierten Partikel zweimal mit je 250 µl Ethanol gewaschen und für den nachfolgenden Beschuss in 60 µl Ethanol resuspendiert. Zwiebeln wurden in Stücke geschnitten und auf feuchtes Filterpapier platziert. Anschließend wurden diese Stücke in der ‚Biolistic®-PDS-1000/He Particle delivery system‘ Apparatur (Bio-Rad, München) durch einen Heliumdruckstoss von 1100 psi mit den DNA-beladenen Goldpartikel unter einem Vakuum von 0,1 bar beschossen. Zur Expression der Proteine wurden die Zwiebelstücke ca. 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes Olympus BX51 und den Filtern: EYFP (F41-028; Anregungsfilter HQ500/20, Sperrfilter HQ535/30) und ECFP (F31-044; Anregungsfilter D436/20, Sperrfilter D480/40) wurde die Lokalisation der Fusionsproteine in einzelnen Zwiebelepidermisschichten nachgewiesen. Fotos wurden unter zu Hilfenahme der CCD Camera (ColorViewII) mit der Software ‚analySIS3.1 Imaging‘ gemacht.

## 2.9 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der Kit ‚NucleoSpin™ Plasmid‘ (Macherey & Nagel, Düren) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Für größere Mengen Plasmid-DNA wurden die Midi- und Maxi-Säulen der Firma Macherey & Nagel eingesetzt.

Alternativ wurde auch die Koch-Methode durchgeführt (Riggs und McLachlan, 1986). Diese Methode hat den Vorteil, sehr schnell und kostengünstig zu sein. Jedoch reicht die Qualität der Plasmid-DNA für Sequenzierungen nicht aus.

5 ml einer Übernachtskultur (LB-Medium mit Antibiotika) wurden abzentrifugiert (1 min bei 1500 x g) und das Zellpellet in 200 µl BF-Puffer mit Lysozym (1mg/ml) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch eine Inkubation bei 100 °C für 1 min. Die Deckel der Eppendorfgefäße wurden mit einer Kanüle angestochen, um einen Druckausgleich beim Kochen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf Eis inkubiert. Im nachfolgenden Zentrifugationsschritt (30 s, 15700 x g) wurden Zelltrümmer und genomische DNA sedimentiert. Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol-Mix versetzt und sorgfältig gemischt. Die Plasmid-DNA wurde dadurch präzipitiert und durch anschließende Zentrifugation (10 min 15700 x g) pelletiert. Die Überstände wurden dekantiert und das DNA-Pellet mit 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen. Die Pellets wurden nun getrocknet und in 100 µl A. dest. aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Einer Extinktion von 1 entspricht dabei eine Konzentration von 50 µg DNA/ml.

<b>BF-Puffer:</b>	8 % Sucrose (w/v) 0,5 % Triton X-100 (v/v) 50 mM EDTA, (pH 8,0) 10 mM Tris/HCl, (pH 8,0)
<b>Lysozym-Stammösung</b>	20 mg/ml in A. dest., bei -20 °C lagern (Biomol, Hamburg)
<b>Isopropanol-Mix (pro Probe)</b>	400 µl Isopropanol 80 µl 5 M Ammoniumacetat (in A. dest.)

### 2.9.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* (Robzyk und Kassir, 1992)

10 ml einer Übernachtskultur in Minimalmedium wurden abzentrifugiert und das resultierende Pellet in 100 µl STET-Puffer (8 % Sucrose (w/v), 50 mM Tris/HCL pH 8.0, 50 mM EDTA, 5 % Triton X-100 (v/v)) aufgenommen. Der Ansatz wurde in ein Eppendorfgesäß überführt und ca. 200 mg Glaskügelchen (425-600 µm) hinzugegeben. Der Zellaufschluß erfolgte nun durch 5 minütiges kräftiges Schütteln. Anschließend wurden 100 µl STET-Puffer hinzugefügt und der Ansatz für 3 min bei 100 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Probe kurz auf Eis gestellt und dann für 10 min zentrifugiert (3000 x g, 4 °C). 100 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Zum Ansatz wurden nun 50 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc hinzugegeben und das Gemisch bei -20 °C für 1 h inkubiert. Das damit gefällte Protein wurde im nachfolgenden Zentrifugationsschritt (10 min, 3000 x g, 4 °C) pelletiert. 100 µl des Überstandes wurden mit 200 µl eiskaltem Ethanol gemischt. Die gefällte DNA wird nun bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Das Plasmid-Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und am Schluss in 20 µl A. dest. aufgenommen. 10 µl Plasmid-DNA wurden für eine anschließende Transformation von *E. coli* (2.8.1) eingesetzt.

### 2.9.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae* (Hoffman und Winston, 1987)

5 ml einer Übernachtskultur in YEPD von *S. cerevisiae* wurden 2 min bei 1500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 0,5 ml sterilem destilliertem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde zu den Zellen 0,2 ml Lysis-Puffer (2 % Triton X-100 (v/v), 1 % SDS (w/v), 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCL pH 8.0), 0,2 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 g Glaskügelchen (425-600 µm) hinzugegeben. Der Aufschluß wurde durch 3 minütiges kräftiges Schütteln erzielt. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer wurde der Ansatz zentrifugiert (5 min 14000 x g). Die wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA in 1 ml 100 %-igem Ethanol gefällt. Durch eine 2 minütige Zentrifugation bei 14000 x g wurde die DNA pelletiert. Nach Trocknung des Sedimentes wurde die DNA in 50 µl A. dest. gelöst.

### 2.9.4 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

Etwa 500 mg Blattmaterial wurden mit einem Pistill in einem Eppendorfgefäß homogenisiert, mit 0,2 ml CTAB-Extraktionspuffer versetzt und 15 min bei 65 °C inkubiert. Nach dem Vermischen mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, v/v) und einer anschließenden Zentrifugation (3 min, 7500 x g, RT) wurde die obere, wässrige Phase mit 65 °C warmer 0,1 Vol. CTAB/NaCl-Lösung versetzt und 3 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 20.000 x g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl A. dest. aufgenommen.

<b>CTAB-Extraktionspuffer</b>	100 mM Tris/HCl, pH 8,0
	20 mM EDTA, pH 8,0
	1,4 M NaCl
	2 % (w/v) CTAB
	2 % (w/v) β-Mercaptoethanol (frisch dazugegeben)
<b>CTAB / NaCl-Lösung</b>	10 % (w/v) CTAB
	0,7 % (w/v) NaCl

### 2.9.5 RNA-Isolierung aus pflanzlichem Gewebe

Die RNA wurde aus Samen und Keimlingen mit Hilfe des ‚Spin Plant RNA Mini Kit‘ (Invitek, Berlin-Buch) nach Angaben des Herstellers isoliert. Es wurden hierfür nur RNase-freie Lösungen und Gerätschaften verwendet. A. dest. und wässrige Lösungen wurden soweit zulässig mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, mindestens 2 h gerührt und dann zweimal 20 min autoklaviert.

### 2.9.6 Isolierung von RNA aus *S. cerevisiae* (Cross und Tinkelenberg, 1991)

15 ml einer logarithmisch wachsenden Hefekultur (Minimalmedium mit 0,3 % Glukose) wurden für 2 min mit 1000 x g zentrifugiert und kurz in 1 ml eiskaltem TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen. Zu den Zellen wurden Glaskügelchen, 350 µl Cross-RNA-Puffer 1 (0,3 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2 % SDS) und

350 µl Phenol/Chloroform/TE (50:49:1) zugegeben. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch 5 minütiges starkes Schütteln bei 4 °C. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 14000 x g erfolgte die Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde in 1 ml vorgekühlten (-20 °C) EtOH überführt und bei -20 °C gefällt. Die ausgefallene RNA wurde zentrifugiert (4 °C, 10 min bei 14000 x g) und in DEPC-behandelten A. dest. bei 65 °C gelöst. Die RNA-Konzentration wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt, wobei eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Bevor die RNA in cDNA umgeschrieben wurde, ging eine DNaseI-Behandlung (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers voraus (2.10).

### 2.10 Reverse Transkription

Als Matrize für die Einzelstrang-cDNA-Synthese mittels Superscript<sup>TM</sup>II (Invitrogen, Karlsruhe) diente RNA (2.9.5). Als Primer wurden ‚random‘- bzw. ‚oligo d(T)‘-Primer verwendet. Die Synthesereaktion erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die cDNA wurde als Template für PCR-Reaktionen eingesetzt.

### 2.11 Histochemischer $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Assay

In dieser Arbeit wurde die Aktivität von Promotoren aus *A. thaliana*, die mit *GUS* als Reportergen gekoppelt waren, *in planta* mit Hilfe einer Farbreaktion nachgewiesen. Die Aktivierung der Promotoren resultiert in einer Expression des *GUS*-Gens. Das kodierte Enzym ist in der Lage X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Glucuronsäure-Cyclohexylammonium-Salz) durch Hydrolyse zu spalten. Es entsteht dabei ein blaues Indoxylderivat. Somit werden die Pflanzenorgane angefärbt, in denen der Promotor aktiv ist.

#### 2.11.1 Herstellung der Promotor-GUS-Plasmide

Das *GUS*-Reportergen wurde mit dem LACS7-Promotor bzw. PXA1-Promotor in den Pflanzentransformationsvektor pC1302m. ligiert und über die bereits beschriebene ‚floral-dip‘-Transformationsmethode (2.8.5) in die Pflanzen eingebracht.

Hierzu wurde zunächst das Plasmid pCAMBIA1302 modifiziert. Das Reportergen GFP wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Hind*III und *Pml*I aus dem Plasmid geschnitten. Zur Erzeugung glatter Enden wurde eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-

Fragment (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Ligation des Vektors wurden neue Restriktionsschnittstellen in den Polylinker eingefügt. Die Primer MCSpC1 und MCSpC2 (100 pmol/μl) wurden dazu gemischt, auf 95 °C erhitzt und langsam (0,3 °C/s) auf 25 °C abgekühlt. Die nun hybridisierten Primer wurden für eine Ligationsreaktion in den zuvor mit *KpnI* verdauten Vektor eingesetzt. Das resultierende Plasmid trägt den Namen pC1302m.

Für die Herstellung des *LACS7*Promotor-GUS-Vektors wurde der pGEM11P7LACS7T-Vektor (Abb. 31) mit den Enzymen *NcoI* und *KpnI* geschnitten. Damit wurde die *LACS7*-cDNA entfernt. In einer PCR-Reaktion wurden unter Verwendung der Primer L7pGUSNcof und L7pGUSKpnr das *GUS*-Gen amplifiziert. Der Vektor pBI101.3 wurde hierfür als Matrize verwendet. Das mit *NcoI* und *KpnI* geschnittene *GUS*-Fragment wurde anschließend in den linearisierten pGEM11-L7pro-OCS3term (Abb. 30) ligiert. Der Name des damit erzeugten Plasmides ist pGEM11P7GUST. Anschließend wurde das Plasmid mit *NotI* verdaut und das entstehende *LACS7*-Promotor-GUS-OCS3-Terminator-Fragment in den ebenfalls mit *NotI* verdauten pC1302m-Vektor kloniert.

Es wurde für die Erzeugung des *PXA1*-Promotor-GUS-Konstruktes der *PXA1*-Promotor mit Hilfe der Primer pxaprSacNot und pctsrev26805 amplifiziert. Als Matrize für diese PCR-Reaktion wurde der BAC-Klon T5J17 verwendet. Der in dem pGEM11P7GUST-Plasmid enthaltene *LACS7*-Promotor wurde durch den Restriktionsverdau mit den Enzymen *SacI* und *NcoI* entfernt. Das verdaute *PXA1*-*SacI*/*NcoI*-Fragment wurde danach in diesen Vektor kloniert. Durch den forward-Primer pxaprSacNot wurde eine zusätzliche *NotI*-Schnittstelle in den Vektor eingefügt. Das erhaltene Plasmid pGEM11PXApGUST wurde nun mit *NotI* geschnitten und das resultierende *PXA1*Promotor-GUS-OCS3Terminator-Fragment in den zuvor verdauten pC1302m ligiert.

### 2.11.2 Analyse der Promotoraktivität

Zur Analyse der entwicklungspezifischen Promotoraktivität wurden Keimlinge und bestimmte Pflanzenorgane wie Blüten, Blätter oder Schoten in dem X-Gluc-Puffer für ca. 1 Tag bei 37 °C inkubiert. Diesem Inkubationsschritt ging eine kurze Vakuumbehandlung des Pflanzenmaterials im Exikator voraus. Die damit erreichte Entlüftung resultiert in einer besseren Infiltration des Substrates X-Gluc in die Pflanzen. Die Farbreaktion wurde gestoppt durch den Austausch des X-Gluc-Puffers mit 70 %-igem Ethanol. Die Färbung des Pflanzenmaterials wurde anschließend unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert.

<b>X-Gluc-Puffer</b>	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0
	10 mM EDTA, pH 7,0
	0,5 mM Ferricyanid
	0,5 mM Ferrocyanid
	2 mM X-Gluc (100 mg X-Gluc in 2 ml DMSO gelöst)
	0,1 % Triton X-100 (v/v)
	A. dest.

## 2.12 Proteinanalysen

### 2.12.1 Expression rekombinanter Proteine

#### 2.12.1.1 Expression in *E. coli*

Zur Charakterisierung des pflanzlichen PXA1-Transporters und der peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetase Fat2p wurden diese mit dem pET-Vektor-System (Novagen, Heidelberg) in *E. coli* exprimiert. Die klonierte DNA wird dabei durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase ist im *E. coli*-Genom integriert. Dieses Gen steht unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und ist daher durch IPTG induzierbar.

Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden zunächst mit den Expressionsplasmiden transformiert (2.8.1). Von den transformierten *E. coli*-Zellen wurde eine 5 ml LB-Übernachtskultur (mit entsprechenden Antibiotikazusatz) angezogen, die zum Animpfen von 100 ml LB-Medium verwendet wurde. Um die optimalen Expressionsbedingungen herauszufinden, wurden unterschiedliche Expressionsbedingungen gewählt. Die Zellen wurden bei verschiedenen Temperaturen (10 °C, 20 °C, 37 °C) bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 angezogen und anschließend die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Die Induktionsdauer betrug bei den Temperaturen 20 °C und 37 °C 3 h und bei 10 °C 24 h bzw. 48 h. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (3200 x g, 20 min) sedimentiert. Das Pellet wurde in 3 ml Puffer (25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0; 20 % Glycerol (v/v); 100 mM KCl) resuspendiert. Es folgte eine 4-malige Ultraschallbehandlung für jeweils 20 s und eine erneute Zentrifugation für 20 min bei 3200 x g. Die Expressionsstärke der Proteine im Überstand wurde anschließend mittels Western-Blot (2.12.6) analysiert.

### 2.12.1.2 Expression in *S. cerevisiae*

Das pYESNTC-Vektor System der Firma Invitrogen (Karlsbad) wurde zur Expression von Proteinen in *S. cerevisiae* benutzt. Das zu untersuchende Gen steht dabei unter der Kontrolle des mit Galaktose induzierbaren *GALI*-Promotors. Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden zuerst mit dem Expressionsplasmid transformiert (2.8.2). Von einer frisch transformierten *S. cerevisiae*-Kolonie wurde dann 50 ml Minimalmedium ohne Uracil mit 2 % Raffinose (w/v) angeimpft und für 3-4 Tage bei 30 °C schüttelnd inkubiert, bis eine  $OD_{600} = 1,4 - 1,8$  erreicht wurde. Die Zelldichte wurde dann auf eine  $OD_{600}$  von ca. 0,8 in Minimalmedium mit 2 % Galaktose eingestellt. Nach einer 8-stündigen Proteinexpression bei 30 °C wurden die Zellen 5 min bei 1500 x g abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Membranen isoliert (2.12.2), das Protein daraus gelöst und in Liposomen inkorporiert (2.20.1). Die Expression wurde mittels Western-Blot überprüft (2.12.6).

### 2.12.2 Isolierung rekombinanter Proteine aus Membranen

Das Zellpellet einer 50 ml *S. cerevisiae*-Kultur (2.12.1.2) wurde in 250 µl Aufschlusspuffer aufgenommen. Nachdem 400 mg Glasperlen (425-600 µm) hinzugefügt wurden, erfolgte der Zellaufschluss durch 5-minütiges starkes Schütteln. Es wurden zusätzliche 750 µl Aufschlusspuffer dem Ansatz beigefügt und zentrifugiert (1 min bei 4500 x g). Die Membranen befanden sich danach im Überstand. Dieser wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 8000 x g für 1 min zentrifugiert. Auch nach diesem Schritt befanden sich die Membranen im Überstand, der erneut in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 12500 x g wurde der Überstand in ein Ultrazentrifugationsröhrchen (Ti70) überführt. Die Membranen wurden bei 100000 x g für 1 h pelletiert. An dieser Stelle wurden die Membranen entweder bei -20 °C eingefroren oder in 200 µl Solubilisierungspuffer (10 mM Tricine KOH, pH 8.8, 1 mM EDTA) gelöst. Durch Zugabe von 40 µl 20 %-ige OGP-Lösung (w/v) (n-Octyl-β-D-glucopyranoside, Calbiochem, Darmstadt) wurden die Proteine aus der Membran gelöst. Die Lösung klarte sich schon nach kurzer Zeit auf. Die Proteinlösung wurde dann sofort für Liposomenassays (2.23.1) eingesetzt.

**Aufschlusspuffer:** 10 mM Tris/HCl pH 8.0  
1 mM EDTA  
1 mM PMSF (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>FO<sub>2</sub>S)  
1 Tablette 'Protease Inhibitor Cocktail Tablets'(Roche) in 10 ml Puffer

### 2.12.3 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Methode beruht auf einem colorimetrischen Test von hoher Empfindlichkeit. Die Bindung des Farbstoffes „Serva Blau D“ an Protein lässt sich durch die Zunahme der Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmen. Das Farbreagenz wechselt bei Anwesenheit von Proteinen seine Farbe von rot zu blau. Der Protein-Farbkomplex wird innerhalb von 2 min gebildet und ist etwa eine Stunde stabil.

Der Proteingehalt der Proben wurde anhand einer Eichgerade ermittelt. Diese Eichreihe wurde im Bereich von 0-20 µg BSA erstellt. Zu 2 ml Farbreagenz wurden 1-100 µl Probe hinzugefügt und die Extinktion bei 595 nm gemessen.

**Farbreagenz:** 14 mg Serva Blau G  
10 ml 96 %-iges Ethanol  
20 ml 85 %-ige Phosphorsäure  
auf 200 ml mit A. dest. auffüllen

### 2.12.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteingemischen und wurde in Anlehnung an Laemmli, (1970) durchgeführt. Bei der Probenvorbereitung wurde mit Hilfe des anionischen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) im Probenpuffer die Eigenladung der Proteine überdeckt. Dazu wurde zu 1-10 µg Protein (2.12.1) 1 Vol. Probenpuffer hinzugefügt. Zusätzlich wurden die Proteine durch eine Inkubation für 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Auftrennung wurden die denaturierten Proben auf ein Polyacrylamid-Gel geladen. Das Gel bestand aus einem Trenngel, über das eine niedrige Schicht Sammelgel gelagert war. Es wurde die ‚Mini-PROTEAN® 3 Cell‘-Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad, München) verwendet. Das Anlegen einer Stromstärke von 15 min bei 15 mA und anschließend 30 min bei 30 mA bewirkte eine Wanderung der negativ geladenen Proteine durch das Gel. Um die Größe der Proteine abschätzen zu können, wurde zusätzlich zu den Proben 6 µl Größenmarker

(,Unstained Protein Molekular Weight Marker', Fermentas, St. Leon-Rot) aufs Gel geladen. Zur Sichtbarmachung der Proteine nach der Elektrophorese schloss sich eine Coomassie-Färbung (2.12.5) oder ein Western-Blot (2.12.6) an.

**10 %-ige Trenngel-Lösung:**

10 % (w/v) Acrylamid  
2,7 % (w/v) Bisacrylamid  
250 mM Tris-HCl, pH 8,8  
0,1 % (w/v) SDS  
5 % (v/v) Glycerin  
0,4 % (v/v) TEMED  
0,05 % (w/v) APS

**3,75 %-ige Sammelgel-Lösung:**

3,75 % (w/v) Acrylamid  
1 % (w/v) Bisacrylamid  
125 mM Tris-HCl, pH 6,8  
0,1 % (w/v) SDS  
0,4 % (v/v) TEMED  
0,08 % (w/v) APS

**Probenpuffer:**

100 mM Tris/HCl, pH 6,8  
2,5 % (w/v) SDS  
20 % (v/v) Glycerin  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

**Elektrophoresepuffer:**

25 mM Tris  
200 mM Glycin  
0,1 % (w/v) SDS  
pH 8,3

**2.12.5 Coomassie-Färbung**

Die Färbung mit Coomassie ist die Standard-Methode, um Proteine im Polyacrylamid-Gel sichtbar zu machen. Die Coomassie-Färbelösung enthält Methanol, um den Coomassie-Farbstoff in Lösung zu bringen und Essigsäure, um die Proteine im Gel zu fixieren. Der blaue Farbstoff lagert sich an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren an und färbt so alle Proteine unspezifisch an. Die Gele wurden ca. 1 h in der Färbelösung inkubiert und anschließend so lange in Entfärberlösung geschüttelt, bis die Proteine deutlich zu erkennen waren und der Hintergrund nahezu farblos war.

**Färbelösung:**

0,25 % (w/v) Coomassie Blue (Serva Blau R)  
40 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure

**Entfärber:** 50 % Methanol (v/v)  
10 % Essigsäure (v/v)

### 2.12.6 Western-Blot

#### 2.12.6.1 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (2.12.4) erfolgte der Transfer dieser durch das Naßblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Machery-Nagel, Düren). Es wurde dazu eine ‚Mini Trans-Blot® Cell‘-Apparatur (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und ein elektrisches Feld angelegt, so dass die Proteine für 1 h bei 80 V und ca. 8 °C transferiert wurden. Die Proteine blieben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membran haften. Bei diesem Vorgang wurde das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Zur Überprüfung, ob der Transfer erfolgreich war, wurde die Membran für ca. 5 min in ‚Fast Green‘-Färbelösung (0,1 % ‚Fast Green‘ in 1% Essigsäure (v/v) gelöst) gelegt. Mit dieser reversiblen Färbemethode konnten Proteine sichtbar gemacht werden. Bevor die Proteine wieder völlig in 0,1 M NaOH entfärbt wurden, erfolgte eine Markierung der Markerproteine mit Bleistiftstrichen.

**Transferpuffer:** 25 mM Tris-HCl, pH 8,3  
250 mM Glycin

#### 2.12.6.2 Proteinnachweis über ‚Enhanced Chemiluminescence‘ (ECL)

Die Nitrocellulose-Membran (2.12.6.1) wurde kurz in TBS-Puffer gewaschen und zur Absättigung überschüssiger Bindungsstellen für eine Stunde in Blockpuffer inkubiert. Dieser Schritt, wie auch alle nachfolgenden, erfolgte bei Raumtemperatur und unter kontinuierlichem Schütteln. Nachdem die Membran für 2 min in TBST-Puffer gewaschen wurde, erfolgte eine 1-stündige Inkubation in ca. 10 ml der Lösung des 1. Antikörpers (siehe Tabelle 5) in TBST. Durch nachfolgende Waschschrte (3 x 5 min in TBST) wurden schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Eine zweite Antikörperlösung wurde für eine weitere Stunde zur Membran gegeben. Dieser Antikörper bindet spezifisch an den 1. Antikörper. Nach weiteren Waschrten (3 x 5 min in TBST) erfolgte nun die

Visualisierung der Antikörpermoleküle mittels Chemiluminescence. Dazu wurde das ECL-Kit (Amersham Bioscience, Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Mit diesem System ist es möglich, das Enzym HRP (,horseradish peroxidase'), welches an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, nachzuweisen. Diese HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der Lumineszenz (Lichtemission) detektiert werden kann. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei in Frischhaltefolie verpackt und auf dem ,high performance chemiluminescence film' (Amersham Bioscience, Freiburg) für 5-10 min exponiert. Dieser wurde nachfolgend entwickelt (Optimax X-Ray Film Processor).

**TBS-Puffer:** 10 mM Tris-HCl pH 8,0  
150 mM NaCl

**TBST-Puffer:** TBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20 (v/v)

**Blockpuffer:** 3 % (w/v) BSA in TBS-Puffer

**Tabelle 5: verwendete Antikörper**

<b>Antigen</b>	<b>1. Antikörper (Verdünnung)</b>	<b>2. Antikörper /Nachweis (Verdünnung)</b>
His-Tag PXA1 in <i>E. coli/S. cerevisiae</i> (134 kDa)	Anti-His (1:1000)	Anti-mouse-IgG-HRP, ECL (1:10000)
Isocitratlyase <i>A. thaliana</i> (64 KDa)	Anti-ICL (1:2000)	Anti-rabbit-IgG-HRP, ECL (1:10000)

### 2.13 DNA-Sequenzierung

Die zu sequenzierende DNA wurde mit 'ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1' (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) amplifiziert. Dazu wurde der PCR-Ansatz unter den unten beschriebenen PCR-Bedingungen inkubiert. Die Sequenzierung der gereinigten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des automatischen Sequenzierers ,ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer' (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Sanger *et. al.* (1977).

<b>PCR-Reaktionsansatz:</b>	2 µl ‚Ready Reaction‘ Mix		
	1 µl DNA (~250 ng Plasmid DNA)		
	1 µl Primer (10 pmol)		
	6 µl A. dest.		
<b>PCR-Bedingungen:</b>	Denaturierung	96 °C	1 min
	Denaturierung	96 °C	10 s
	‘Annealing‘	50 °C	5 s
	Polymerisation	60 °C	4 min
	4 °C	∞	

} 25 Cyclen

#### 2.14. Bestimmung von Acyl-CoA-Estern (Larson und Graham, 2001)

Die auf Fluoreszenzdetektion basierende Methode ist hochsensitiv und erlaubt die Quantifizierung von Acyl-CoA-Estern aus pflanzlichem Gewebe bzw. aus *S. cerevisiae*. Es können Acyl-CoA-Ester mit den Kettenlängen C4 bis C20 und Konzentrationen über 6 fmol gemessen werden. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass extrahierte Acyl-CoA-Ester durch eine Derivatisierungsreaktion in fluoreszierende Acyl-*etheno*-CoA-Ester überführt werden. Diese werden anschließend durch ‚High Performance Liquid Chromatography‘ (HPLC) aufgetrennt und mittels eines Fluoreszenzdetektors registriert.

##### 2.14.1 Extraktion von Acyl-CoA-Ester aus *A. thaliana*

20-50 mg Pflanzenmaterial wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und in 200 µl Extraktionspuffer mit einem Pistill homogenisiert. Als interner Standard wurde Heptadecanoyl-CoA (0,1 nmol) hinzugefügt. In den nachfolgenden Waschschrritten wurden Lipide und Pigmente entfernt. Nach Zugabe von 300 µl Waschpuffer (Petroleum Ether 40-60 °C gesättigt mit 1:1 (v/v) Isopropanol:Wasser) wurden die Proben für 1 min bei 100 x g zentrifugiert und die Oberphase verworfen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde 5 µl gesättigte (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lösung zu den Proben gegeben, gefolgt von 600 µl Methanol:Chloroform 2:1 (v/v). Die Ansätze wurden gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation bei 16000 x g wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei 50 °C unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Wenn keine Phasentrennung erfolgt war, wurde der gesamte Ansatz bis zur

Trockne eingedampft. Die Proben standen nun für die Derivatisierungsreaktion (2.14.3) bereit.

**Extraktionspuffer:**            2 ml Isopropanol  
                                      2 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2  
                                      50  $\mu\text{l}$  Essigsäure  
                                      80  $\mu\text{l}$  BSA (50 mg/ml  $\text{H}_2\text{O}$ , entfettet)

### **2.14.2 Extraktion von Acyl-CoA-Estern aus *S. cerevisiae* (modifiziert nach Rosendal und Knudsen, 1992)**

Zu 6 ml einer *S. cerevisiae*-Kultur wurde 1/10 Vol. 6.6 M Perchlorsäure hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 3200 x g für 5 min bei 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde in 5 ml 10 mM Perchlorsäure resuspendiert. Nachdem die Zellen erneut abzentrifugiert wurden, bestand die Möglichkeit entweder die Zellen bei -80 °C zu lagern oder mit der Extraktion fortzufahren.

Alle nachfolgenden Schritte wurden, soweit nicht anders vermerkt, auf Eis durchgeführt. Als interner Standard wurde Heptadecanoyl-CoA (0,1 nmol) mitgeführt. Das Zellpellet wurde in 800  $\mu\text{l}$  A. dest. aufgenommen. Nachdem noch 3 ml Chloroform:Methanol 2:1 (v/v) und ca. 200 mg Glaskügelchen (425-600  $\mu\text{m}$ ) hinzugefügt wurden, erfolgte der Zellaufschluss durch 5-minütiges kräftiges schütteln. Anschließend wurden 1 ml Chloroform und 1 ml Wasser hinzugefügt und die Probe erneut für 30 s kräftig geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte im nachfolgenden Zentrifugationsschritt für 10 min bei 3200 x g. Nach Entnahme der Ober- und Unterphase wurde die verbleibende proteinhaltige Interphase unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Extraktion der Acyl-CoA-Ester erfolgte durch Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Extraktionspuffer (2.13.1), 10  $\mu\text{l}$  gesättigte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und 1,2 ml Methanol:Chloroform 2:1 (v/v) und anschließendes 3-minütiges kräftiges schütteln. Die Ansätze wurden nun 20 min bei RT inkubiert und danach für 5 min bei 3200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und für 2 min bei 16000 x g zentrifugiert. Unter einem Stickstoffstrom wurde der resultierende Überstand bei 50 °C bis zur Trockne eingedampft. Es folgte nun die Derivatisierung der extrahierten Acyl-CoA-Ester (2.14.3)

### 2.14.3 Derivatisierung von Acyl-CoA-Estern

Zu den eingedampften Proben (2.13.1, 2.13.2) wurde 200 µl Derivatisierungsreagenz gegeben. Die Derivatisierung der Acyl-CoA-Ester erfolgte in Gegenwart von Chloroacetaldehyd für 20 min bei 85 °C und bei pH-Wert 4. Dabei wurde der Adeninrest des Coenzym A durch eine zusätzliche *etheno* Gruppe modifiziert. Die Proben wurden bis zur HPLC-Analyse max. 7 Tage bei 4 °C aufbewahrt. Eine Lagerung über mehrere Monate erfolgte bei -20 °C).

**Derivatisierungsreagenz:** 0,5 M Chloroacetaldehyd  
0,15 M Citratpuffer, pH 4,0  
0,5 % SDS (w/v)

### 2.14.4 HPLC-Analyse von Acyl-*etheno*-CoA-Estern

Die Analyse der Acyl-*etheno*-CoA-Ester erfolgte mit der LC Agilent 1100 Serie mit einem quaternären Pumpensystem (Agilent, Waldheim). Für die Trennung wurde eine LUNA 150 x 2,0 mm Säule (Phenomenex, Aschaffenburg) mit einer Vorsäule (4 x 2 mm Phenylpropyl guard Säule; Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet. Die Acyl-*etheno*-CoA-Ester wurden unter alkalischen Bedingungen in der Gegenwart von Triethylamin von der Säule eluiert. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor. Die Anregungswellenlänge betrug 230 nm und die Emissionswellenlänge 420 nm. Mit der ‚ChemStation-Software‘ (Agilent, Waldheim) wurden die Signalflächen integriert und quantifiziert.

Laufmittel A	100:1 H <sub>2</sub> O:HOAc					
Laufmittel B	90:9:1 MeCN (gradient grade, MERCK):H <sub>2</sub> O:HOAc					
Laufmittel C	100:0,25 H <sub>2</sub> O:TEA (Triethylamin, SIGMA)					
Laufmittel D	90:10 MeCN (gradient grade, MERCK):H <sub>2</sub> O					
Gradient	Zeit	% B	% C	% D	Fluss (ml/min)	Druck (bar)
	0	10	0	0	0,4	300
	5	80	0	0	0,4	300
	5,1	0	80	0	0,4	300
	7	0	97	3	0,2	300
	10	0	95	5	0,2	300
	10,1	0	95	5	0,2	300
	50	0	55	45	0,2	300
	51,1	0	0	100	0,4	300
	52	0	0	100	0,4	300
	62	0	0	100	0,4	300
	62,1	10	0	0	0,4	300

### 2.15 Enzymatische Herstellung von Acyl-CoA-Estern

Die Identität der detektierten Fluoreszenzsignale (2.14.4) wurde durch Koelution mit Acyl-*etheno*-Ester-Standards überprüft. Da nur ein Teil der benötigten Acyl-CoA-Ester käuflich zu erwerben war, wurden einige Acyl-CoA-Ester enzymatisch hergestellt. Dazu wurden freie Fettsäuren (Sigma, Deisenhofen) mit Hilfe der Acyl-CoA-Synthetase (*Pseudomonas sp.*, Sigma, Deisenhofen) zu Acyl-CoA-Estern umgesetzt im folgenden Reaktionsansatz (200 µl): 100 mM Tris/HCl 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM CoA, 2 mM DTT, 25 µM Fettsäure und 0.4 U Acyl-CoA-Synthetase. Der Ansatz wurde 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Eisessig:Ethanol (1:1) gestoppt. Die freien Fettsäuren wurden in einem nachfolgenden Waschschrift entfernt. Dazu wurden 200 µl gesättigter Petrolether 40-60 °C dem Gemisch beigelegt. Die dabei entstehende Unterphase wurde auf eine Strata C18-E Säule (Phenomenex, Aschaffenburg) geladen. Die Säule wurde zuvor mit einem Laufmittelgemisch A und B, 1:1 (v/v) (2.13.4) äquilibriert. Die Acyl-CoA-Ester waren nun am Säulenmaterial gebunden und wurden mit 1 ml Laufmittelgemisch A und B 1:1 gewaschen. Im nachfolgenden Schritt wurde 1 ml Laufmittel C auf die Säule gegeben. Es folgte 1 ml des Laufmittelgemischs C:D, 95:5 (v/v). Im letzten Schritt wurden die Acyl-CoA-Ester mit zweimal 500 µl Laufmittel D von der Säule eluiert. Die Proben wurden unter Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und in 200 µl 50 mM MES-Puffer, pH 5 aufgenommen.

### 2.16 Saure Methanolyse (Miquel und Browse, 1992)

Freie und veresterte Fettsäuren in Samen und Keimlingen von *A. thaliana* wurden nach der Methode der sauren Methanolyse analysiert. Dazu wurden 10 Samen bzw. Keimlinge unter Zugabe von internem Standard (20 µg Triheptadecanoat) in 1 ml Fettsäuremethylester (FAME)-Lösung (2,5 %-ige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Methanol + 2 % Dimethoxypropan) für 3 h in einem Wasserbad in Glasgefäßen inkubiert. Anschließend wurde bei RT 1,5 ml 0,9 %-ige NaCl hinzugefügt. Die Extraktion der entstandenen Fettsäuremethylester erfolgte durch Zugabe von 1 ml Hexan und 1-minütiges starkes schütteln. Die Hexanphase wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Die FAME wurden nun in 20 µl Acetonitril gelöst und in ein GC-Probenglas transferiert. Diese wurden entweder bei -20 °C gelagert oder direkt der gaschromatographischen Trennung zugeführt (2.17, Temperaturprogramm:A).

### 2.17 Analyse von FAME durch Gaschromatographie (GC)

FAME sind bei hohen Temperaturen in die Gasphase überführbar. Diese Eigenschaft wurde während der gaschromatographischen Trennung mit der Agilent GC 6890 Serie ausgenutzt. Die Auswertung der Signalfächen erfolgte mit der ChemStation-Software (Agilent, Waldheim).

Säule DB-23, 30 m x 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm (Agilent, Waldheim)  
 Trägergas Helium (konst. Fluß, 1ml/min)  
 Injektion Split-Modus, 220 °C

-Temperaturprogramm: A

150 °C 1 min  
 150 °C - 200 °C, 8 °C/min  
 200 °C - 250 °C, 25 °C/min  
 250 °C, 6 min

-Temperaturprogramm: B

150 °C 1 min  
 150 °C - 160 °C, 10 °C/min  
 160 °C - 200 °C, 6 °C/min  
 200 °C - 250 °C, 25 °C/min  
 250 °C, 4 °C

### 2.18 Analyse von $\alpha$ -Oxidationsintermediaten mittels GC-MS

FAME wurden nach der Methode der sauren Methanolyse aus Keimlingen extrahiert (2.14). Die Proben wurden in 3 µl Acetonitril gelöst und mit 1 µl BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, Sigma, Deisenhofen) versetzt. Damit werden die Hydroxygruppen der Fettsäuren derivatisiert. Anschließend erfolgte die gaschromatographische Auftrennung und massenspektrometrische Detektion mittels GC-MS (Agilent GC 6890 System gekoppelt mit dem Agilent 5973 N MS-Detektor (Agilent, Waldbronn)).

Methode	FAMEDB15
Säule	122-2332 DB-23, 30 m x 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm (J&W, Scientific, Agilent)

Trägergas	Helium (konst. Fluß, 1 ml/min)		
Injektion	Split-Modus, 220 °C		
Temp.-Gradient	°C/min	°C	min
		150	1
	4	200	0
	5	250	6
Gesamtzeit	29,50 min		
Ionisierung	Elektronenstoß-Ionisierung		
Elektronenenergie	70 eV		
Quellentemperatur	230 °C		
Transferline-Temperatur	260 °C		
Quadrupoltemperatur	150 °C		
Detektion	Full-Scan (50-650)		
Injektionsvolumen	2 µl		

### 2.19 Lipidextraktion aus *S. cerevisiae*

Mit Hilfe der Chloroform-Methanol-Methode von Bligh und Dyer, (1959) wurden Lipide aus *S. cerevisiae* extrahiert. Das Zellsediment von einer 6 ml *S. cerevisiae*-Kultur (2.4) wurde in 1 ml A. dest. resuspendiert und in ein Glasreaktionsgefäß überführt. Für den Zellaufschluss wurden Glaskügelchen (425-600 µm) verwendet. Die Extraktionslösung setzte sich aus 25 µl 1 M HCl, dem internen Standard (Heptadecansäure für freie Fettsäuren bzw. Triheptadecanoat für veresterte Fettsäuren) und 3 ml Chloroform:Methanol (2:1) (v/v) zusammen. Die Menge an eingesetztem internen Standard betrug für die *S. cerevisiae*-Mutanten 10 µg bei freien und veresterten Fettsäuren und für den Wildtyp-Stamm 6 µg bei den veresterten Fettsäuren und 1 µg bei den freien Fettsäuren. Die Extraktionslösung wurde mit dem Pellet für 3 min geschüttelt. Anschließend wurden die Lipide durch sehr kräftiges schütteln bei 4 °C für 2 Stunden extrahiert.

Für eine deutliche Phasentrennung wurde nach der Extraktion 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung (w/v) zur Probe gegeben und bei 160 x g für 5 min zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde anschließend mit einer Glaspipette in ein neues Glasreaktionsgefäß transferiert und unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Der gewonnene Lipidextrakt wurde in 100 µl Methanol:Chloroform (1:1) aufgenommen und bei -20 °C bis zur Methylierung (2.20) aufbewahrt.

### 2.20 Methylierung von freien Fettsäuren (op den Camp *et al.*, 2003)

Für die Methylierung von freien Fettsäuren wurden 40 µl des Lipidextraktes (2.19) unter einem Stickstoffstrom getrocknet und dann in 400 µl Methanol aufgenommen. Anschließend

wurden 10 µl einer EDAC-Lösung (1-Ethyl-3-(3-Dimethyl-aminopropyl)carbodiimid); 1 mg EDAC/10 µl Methanol) zur Probe gegeben und für 2 h bei RT geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl gesättigte NaCl-Lösung gestoppt. Zur Extraktion der entstandenen FAME wurde 1 ml Hexan zugesetzt und das Gemisch kräftig geschüttelt. Durch Zentrifugation (200 x g, 2 min) wurde die Phasentrennung beschleunigt. Die obere Hexanphase wurde vorsichtig mit einer Glaspipette in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und unter Stickstoff bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 10 µl Acetonitril aufgenommen und stand damit für die Gaschromatographie (2.17, Temperaturprogramm: B) bereit

### **2.21 Transmethylierung von veresterten Fettsäuren (modifiziert nach Hornung *et al.*, 2002)**

Die Transmethylierung beinhaltet die Abspaltung von lipidgebundenen Fettsäuren und die gleichzeitige Methylierung dieser Fettsäuren. Für die Transmethylierung wurden 40 µl des Lipidextraktes (2.19) in einem 2-ml-Eppendorfgefäß unter einem Stickstoffstrom eingedampft. Anschließend wurde die Probe in 333 µl Methanol:Toluol (2:1) und 167 µl 0,5 M Natriummethoxid (in Methanol; Sigma, Deisenhofen) aufgenommen. Das Gemisch wurde bei RT für 20 min geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M NaCl und 50 µl HCl (32 %) gestoppt. Zur Extraktion der FAME wurde 1 ml Hexan zugegeben und das Gemisch kräftig geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 3200 x g für 1 min. Die obere Hexanphase wurde vorsichtig mit einer Glaspipette in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Abschließend wurde die Probe in 10 µl Acetonitril aufgenommen und stand für die GC-Analyse (2.17, Temperaturprogramm B) bereit.

### **2.22 Transportassays mit intakten Glyoxysomen**

#### **2.22.1 Glyoxysomen aus etiolierten *A. thaliana*-Keimlingen**

Ca. 1 mg Oberflächensterilisiertes Saatgut von WS und der *pxal-2*-Mutante wurde auf MS-Medium mit 0,5 % Sucrose in einer großen Petrischale (Ø 15 cm) ausgelegt, mit Aluminiumfolie abgedeckt und 4 Tage bei 23 °C inkubiert. Die in dieser Zeit gekeimten Samen wurden nun von der Agaroberfläche gestrichen und das Frischgewicht bestimmt (*pxal-2*-Mutante keimte wesentlich schlechter, ~ 19 g). Alle folgenden präparativen Schritte

wurden bei 4 °C durchgeführt in Anlehnung an ein Protokoll von Nishimura *et al.* (2002). Die etiolierten Keimlinge wurden unter Zugabe von 100 ml Aufschlusspuffer (150 mM Tricine pH 7.2, 1 mM EDTA, 0,3 M Mannitol, 1 % BSA (w/v)) mit einem Wiegemesser grob zerkleinert und anschließend mit dem Polytron für ca. 10 s homogenisiert. Der Rohextrakt wurde nun durch 2 Lagen Miracloth drucklos filtriert. Im anschließenden Zentrifugationsschritt für 20 min bei 13000 x g wurden alle Zellorganellen, aber auch Zelltrümmer sedimentiert. Das Sediment wurde vorsichtig mit Hilfe eines Pinsels in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert.

400 µl des konzentrierten Rohextraktes wurden für eine Transportmessung eingesetzt. Die Inkubation der Peroxisomen im Rohextrakt erfolgte mit 8 µM der radioaktiv markierten Substrate [1-<sup>14</sup>C]-Ölsäure (spezifische Aktivität 56 mCi/mmol) bzw. [1-<sup>14</sup>C]-Oleoyl-CoA (spezifische Aktivität 55 mCi/mmol) sowie 5 µl 100 mM ATP für 30 min bzw. 1.5 h bei RT. Nach diesen Zeiten wurden 200 µl des Ansatzes auf einen Percollgradienten geladen. Der Gradient setzte sich aus 0,5 ml 60 % und 4,1 ml 28 % Percoll (v/v) in 10 mM Tricine pH 7.2, 1 mM EDTA, 0,5 M Saccharose zusammen. Die Gradienten wurden 30 min bei 100000 x g (SW 55Ti, Beckman) zentrifugiert. Die Glyoxysomenbande sollte oberhalb des 60 %-igen Percolls sichtbar sein. Aus dem oberen und mittleren Bereich des Gradienten und der Glyoxysomenbande wurden mit einer Glaspipette Aliquots entnommen und in Szintillationsgefäße mit 8 ml Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier-Safe, Fa. Canberra Packard) überführt. Die Radioaktivität der Proben wurde im Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer 1900 TR, Fa. Canberra Packard) bestimmt.

### **2.22.2 Glyoxysomen aus etiolierten *R. communis*-Keimlingen**

Im Samen von *R. communis* entfallen 60-70 % des Trockengewichts auf Speicherfett des Endosperms (Beever, 1969). Während der Keimung werden daher große Mengen an Fettsäuren freigesetzt, die in Peroxisomen degradiert werden. Daher ist eine entsprechend hohe Anzahl an Peroxisomen im keimenden Samen vorhanden, die mit der von Mettler und Beever (1980) entwickelten Methode isoliert werden können.

Von den 3-4 Tage alten etiolierten *R. communis*-Keimlingen (2.2.5) wurde die Samenschale entfernt. Da die Samenschalen das toxische Protein Ricin enthalten, war es sehr wichtig Handschuhe zu tragen. Die verbleibenden Endospermhälften wurden abgewogen (ca. 50 g) und anschließend in eine Petrischale gegeben. Unter Zugabe von 100 ml kaltem Aufschlusspuffers (450 mM Saccharose, 150 mM Tricin-KOH pH 7,5, 100 µM MgSO<sub>4</sub>, 100

$\mu\text{M}$  KCl,  $50 \mu\text{M}$   $\text{CaSO}_4$  und  $0,1 \%$  (w/v) BSA (entfettet)) wurde das Endosperm mit einer Rasierklinge klein gehackt. Das zerkleinerte Endosperm wurde in ein Polytrongeß überführt und mit einem Pürierstab für ca. 10 s zu einem dicklichen Brei zerkleinert. Das Homogenat wurde durch 2 Lagen Miracloth filtriert und anschließend auf 2 Zentrifugenröhrchen verteilt. Nach einer Zentrifugation von 10 min für  $650 \times g$  wurde mit einer Glaspipette durch die oben schwimmende Fettschicht gestochen und aus dem mittleren Teil des Röhrchens ca. 20 ml Rohextrakt entnommen, ohne dabei das Sediment zu berühren. 12 ml dieses Rohextraktes wurden für einen Transportversuch verwendet. Als Substrat wurden hierzu entweder radioaktiv markierte freie Fettsäuren ( $[1-^{14}\text{C}]$ -Ölsäure, spezifische Aktivität  $56 \text{ mCi}/\text{mmol}$ ) oder Acyl-CoA-Ester ( $[1-^{14}\text{C}]$ -Palmitoyl-CoA, spezifische Aktivität  $60 \text{ mCi}/\text{mmol}$ ;  $[1-^{14}\text{C}]$ -Oleoyl-CoA, spezifische Aktivität  $55 \text{ mCi}/\text{mmol}$ ) dem Rohextrakt bei RT beigelegt (Kontrollansätze enthielten alternativ  $100 \text{ mM}$  ATP bzw.  $5 \text{ mM}$  CoA). Die Inkubationszeit der Ansätze betrug ca. 30 min bzw. ca. 3,5 h. Anschließend wurden 6 ml Probe auf lineare Percoll-Gradienten geladen. Diese wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen, wobei  $15 \text{ ml } 20 \%$  und  $15 \text{ ml } 35 \%$  Percolllösung (v/v) (in  $0,5 \text{ M}$  Saccharose,  $25 \text{ mM}$  Tricine pH 7,5,  $0,1 \%$  (w/v) BSA) benötigt wurden. Die Gradienten wurden bei  $40000 \times g$  (Swing-out Rotor SW 28) für 90 min zentrifugiert. Die Peroxisomenbande war kurz oberhalb des Bodens des Gradientens sichtbar. Die Glyoxysomenfraktion wurde mit einer Glaspipette entnommen, wobei dieser Schritt sehr kritisch war. Zum einen war es schwierig die Bande vollständig abzusaugen und zusätzlich bestand die Gefahr der Kontamination, da man mit der Glaspipette durch die oberen Schichten hindurch stechen musste. Zur Bestimmung der aufgenommenen Substratmenge wurde die Radioaktivität der Glyoxysomenfraktion unter Zuhilfenahme des Szintillationszählers ermittelt.

## **2.23 Bestimmung der Transportaktivität von PXA1 im rekonstituierten System (modifiziert nach Hanning *et al.*, 1999)**

### **2.23.1 Rekonstitution von Gesamtmembranproteinen in Liposomen**

Zur Herstellung von Liposomen wurden  $50 \text{ mg}$  gereinigtes Asolectin (aus Sojabohne, Fluka, Buchs, Schweiz) in  $1 \text{ ml}$  Puffer aufgenommen. Der Puffer hatte folgende Zusammensetzung:  $50 \text{ mM}$  Tris/HCL pH 7,5,  $10 \text{ mM}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $3,5 \text{ mM}$  CoA,  $30 \text{ mM}$  ATP,  $20 \text{ mM}$  Laktat (Sigma, Deisenhofen) und alternativ unterschiedliche Konzentrationen Acyl-CoA-Synthetase aus *Pseudomonas sp.* (Sigma, Deisenhofen). Außerdem wurde zu jedem Messwert

stets eine Kontrolle ohne ATP Vorbeladung der Liposomen mitgeführt, um den Anteil unspezifischen Substrattransportes zu ermitteln. Die Suspension wurde in 1 s-Intervallen in einem Eisbad mit beschallt (Branson Sonifier Cell Disruptor B15, Branson Sonic Power Co.; Micro Tip, Energiestufe 3, 50 % ‚duty‘). Bei 1 ml Ansätzen betrug die Beschalldauer 90 s. Im nächsten Schritt wurden 100-150 µg gelöste Membranproteine aus *S. cerevisiae* (2.12.2) zu den Liposomen gegeben. Das Lipid-Detergenz-Proteingemisch wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend langsam auf Eis aufgetaut. Nach einem zweiten Beschallen (Micro Tip, Energiestufe 3, 20 % duty, 20 s) erfolgte die Abtrennung des nicht inkorporierten Substrats durch Reinigung der Liposomen mittels Anionenaustauschchromatographie (Dowex 1 x 8, 100-200 mesh, Merck). Dazu wurde 1 ml der Liposomen auf eine bis zur Verjüngung mit Säulenmaterial beladene Pasteurpipette gefüllt. Die Äquilibrierung der Säule und die Elution der Liposomen von der Säule erfolgten in Äquilibrierungspuffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 5 mM KCl). Das milchigtrübe Eluat (ca. 1,25 ml pro Säule) wurde aufgefangen und bis zur Messung auf Eis aufbewahrt.

### **2.23.2 Transport von freien und veresterten Fettsäuren in Proteoliposomen**

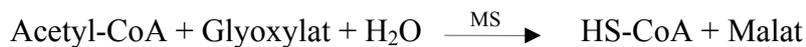
Es wurde der Transport von [1-<sup>14</sup>C]-markierter Ölsäure bzw. Oleoyl-CoA-Ester in unterschiedlich vorbeladene Liposomen (2.23.1) untersucht. Die Substrate wurden zuvor mit entfettetem BSA komplexiert. Das Verhältnis von Fettsäure zu BSA war 3,56:1. BSA wurde dazu in Äquilibrierungspuffer (2.23.1) gelöst und auf 37 °C temperiert. Anschließend wurde das radioaktiv markierte Substrat in dem Puffer gelöst. Dazu wurde der Ansatz 1 min stark geschüttelt. 250 µl dieses Inkubationsmediums enthielten 7,14 µM freie oder veresterte Fettsäure im Komplex mit BSA. Nach Zugabe des markierten Substrates zu den Liposomen wurden diese gemischt und nach verschiedenen Zeitpunkten Aliquots auf eine DOWEX 1 x 8 Anionenaustauschersäule gegeben, die zuvor mit 0,21 M NaAcetat-KOH, pH 7,2 äquilibriert worden war. Der Transport wurde somit gestoppt, das nicht aufgenommene Substrat blieb am Säulenmaterial haften und die Liposomen wurden mit 1 ml 0,21 M NaAcetat-KOH, pH 7,2 von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in Szintillationsgefäßen aufgefangen mit ca. 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler ermittelt.

## 2.24 Enzymaktivitätsbestimmungen

### 2.24.1 Malat-Synthase (MS)-Aktivität (Miernyk *et al.*, 1979)

Die Zuordnung der Glyoxysomenbande im Percollgradient (2.22) wurde durch die Messung des Markerenzym Malat-Synthase verifiziert. Darüber hinaus erfolgte der Vergleich von unterschiedlichen Glyoxysomen-Präparationen über die Aktivität der Malat-Synthase. Zur Bestimmung der Intaktheit von Glyoxysomensuspensionen wurde die Latenz der Malat-Synthase bestimmt. Die Latenz eines Enzyms gibt den prozentualen Anteil der Aktivität an, die nur in Gegenwart von Detergenz messbar ist. Somit wurde die Enzymaktivität der Testansätze mit bzw. ohne Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 0,1% (v/v)) bestimmt, die der Gesamtaktivität bzw. der freien Aktivität entsprechen. Alle Messungen wurden bei 25 °C in einem Zweistrahlphotometer (Kontron; Uvikon 922) durchgeführt.

#### Meßprinzip:



Das enzymatisch gebildete freie Coenzym A wurde quantitative über Bildung eines gelben Farbkomplexes mit 5,5-Dithio-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) nachgewiesen.

Meßgröße war die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit bei 412 nm ( $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

<b>Testansatz</b> (1 ml)	Tris-HCl pH 8,0	70 mM
	MgCl <sub>2</sub>	4 mM
	DTNB	0,1 mM
	Acetyl-CoA	0,1 mM
	TritonX-100	0,1 % (v/v)
	Probe	1 µl

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1,5 mM Glyoxylat

$$\text{Berechnung des Intaktheitsgrad [\%]} = \frac{\text{Gesamtaktivität} - \text{freie Aktivität}}{\text{Gesamtaktivität}} \times 100$$

### 2.24.2 Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität (Fulda *et al.*, 1997)

Meßprinzip:



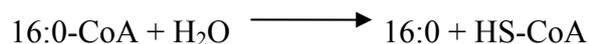
Meßgröße war die Zunahme von  $^{14}\text{C-Oleoyl-CoA}$  pro Zeiteinheit. Der gebildete Acyl-CoA-Ester ist im Gegensatz zur Fettsäure gut wasserlöslich. Substrat und Produkt lassen sich daher nach Abbruch der Reaktion durch Extraktion mit Petrolether voneinander trennen und die Radioaktivität im Szintillationszähler quantifizieren.

Testansatz (100µl)	100 mM	Tris-HCL pH 7.5
	5 mM	rATP
	0,5 mM	CoA
	5 mM	DTT
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 µM	[1- <sup>14</sup> C]-Ölsäure (spezifische Aktivität 56 mCi/mmol)
	1-5 µl	Probe

Die Reaktion wurde durch Zugabe von  $^{14}\text{C-Ölsäure}$  gestartet. Der Testansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,7 ml 3 %-iger (v/v) Essigsäure angesäuert und 0,7 ml Isopropanol beendet. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit je 1,5 ml Petrolether extrahiert und dann 1 ml der unteren Phase in einem Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier-Safe, Fa. Canberra Packard) überführt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte im Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer 1900 TR, Fa. Canberra Packard).

### 2.24.3 Thioesterase-Aktivität

Meßprinzip:



Das enzymatisch gebildete freie Coenzym A wurde quantitativ über die Bildung eines gelben Farbkomplexes mit 5,5-Dithio-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) nachgewiesen.

Meßgröße war die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit bei 412 nm ( $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Testansatz (1 ml)	100 mM	Tris/HCL pH 7,5
	100 $\mu$ M	Palmitoyl-CoA
	100 $\mu$ M	DTNB
	10 $\mu$ l	Probe

Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Palmitoyl-CoA.

#### 2.24.4 $\beta$ -Oxidations-Aktivität in isolierten Glyoxysomen (modifiziert nach Kleiter und Gerhardt, 1998)

Im Rahmen von Transportstudien wurde die  $\beta$ -Oxidations-Aktivität von isolierten *R. communis*-Glyoxysomen gemessen. Dabei wurde sowohl mit intakten als auch osmotisch geschockten Glyoxysomen gearbeitet. Um die Glyoxysomen während des Versuches intakt zu halten, wurde dem Ansatz 350 mM Saccharose zugefügt. Die Glyoxysomenfraktionen wurden entweder mit radioaktiv markierter freier [1- $^{14}$ C]-Ölsäure (gelöst in 0,1 % Trion X-100) oder [1- $^{14}$ C]-Oleoyl-CoA inkubiert. Die  $\beta$ -Oxidation der markierten Substrate wurde über die Bildung von [1- $^{14}$ C]-Acetyl-CoA verfolgt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten durch Auftragen von Aliquots auf eine Dünnschichtplatte (20  $\times$  20 cm, Kieselgel 60, Merck, Darmstadt). Die Auftrennung der Substrate und Produkte durch Dünnschichtchromatographie erfolgte in folgendem Laufmittel: Butanol/Essigsäure/Wasser (5:2:3) für ca. 3 h bei Raumtemperatur. Die radioaktiven Signale wurden mit einem Radio-TLC-Scanner (FLA-3000, Fujifilm, Tokyo, Japan) detektiert.

<b>Testansatz</b> (1ml)	175 mM	Tris/HCL
	350 mM	(Saccharose)
	0,42 mM	NAD
	8 mM	ATP
	3,75 mM	(Oxalacetat)
	7,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,6 mM	CoA
	100 $\mu$ l	Glyoxysomensuspension
	10 $\mu$ M	[1- $^{14}$ C]-Ölsäure (spezifische Aktivität 56 mCi/mmol)
	bzw.	
10 $\mu$ M	[1- $^{14}$ C]-Acyl-CoA (spezifische Aktivität 55 mCi/mmol)	

Die Reaktion wurde durch Zugabe der radioaktiven Substrate gestartet.

### 3. Ergebnisse

Der im Detail bisher nicht verstandene Transportmechanismus von Fettsäuren in die peroxisomale Matrix von *A. thaliana* wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Im ersten Teil der Arbeit sollte die Rolle des peroxisomalen ABC-Transporters PXA1 und dessen Zusammenwirken mit den peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 und LACS7 untersucht werden. Um weitere Erkenntnisse bezüglich der Funktionsweise des pflanzlichen Transporters zu gewinnen, sollte im zweiten Teil der Arbeit der Modellorganismus *S. cerevisiae* herangezogen werden.

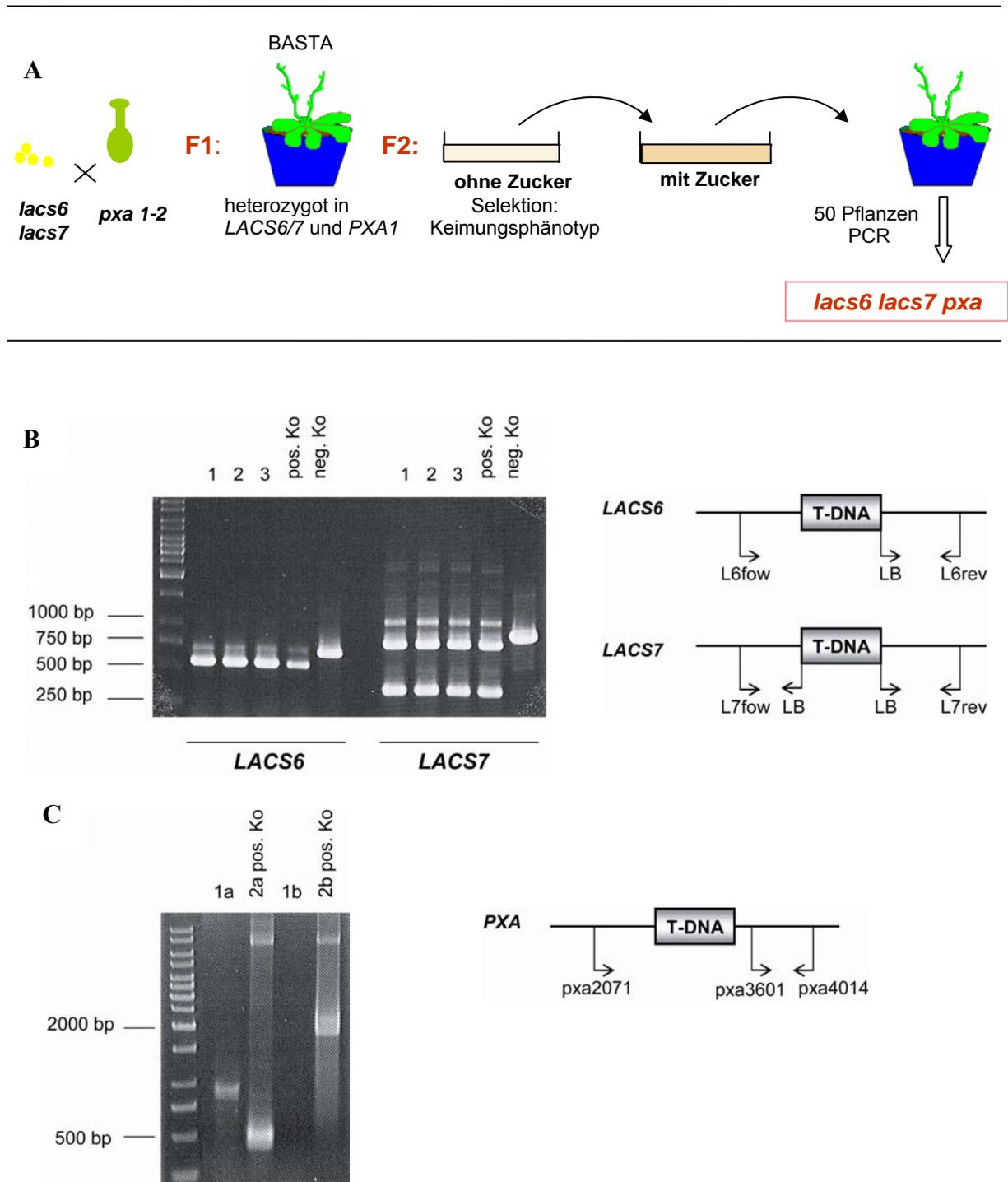
#### 3.1 Untersuchungen zur $\beta$ -Oxidation der Mutante *lacs6 lacs7 pxa*

In *A. thaliana* ist ein Funktionsausfall des peroxisomalen ABC-Transporters PXA1 und der beiden peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetasen LACS6/LACS7 für den Keimling letal (Russell *et al.*, 2000; Zolmann *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2004). Nur durch Zugabe von Saccharose zum Wachstumsmedium sind die entsprechenden Mutanten in der Lage, sich als Keimlinge zu etablieren. Interessanterweise sind die Mutanten *cts1* und *cts2* und *lacs6 lacs7* auf zuckerhaltigem Medium zu einem stark verlangsamten Abbau der Reservelipide fähig (Footitt *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2004). Es sollte geklärt werden, ob diese verbliebene Fähigkeit zur  $\beta$ -Oxidation auf eine komplementierende Wirkung zwischen peroxisomalen LACS und PXA1 zurückzuführen ist oder einem anderen unabhängigen Importsystem bzw. Abbauprozess zuzuordnen ist. Hierzu sollte zunächst die Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* erstellt werden.

##### 3.1.1 Herstellung der Dreifach-Mutante *lacs6 lacs7 pxa*

Zur Erzeugung der Dreifach-Mutante wurden die homozygoten Mutanten *pxa1-2* und *lacs6 lacs7* verwendet (Fulda *et al.*, 2004). Durch die Insertion einer T-DNA in den Genen wurde der offene Leserahmen zerstört, so dass kein funktionelles Genprodukt mehr erzeugt werden kann. Durch die Bestäubung der *pxa1-2*-Mutante mit den Pollen der *lacs6 lacs7* Doppelmutante wurde bei erfolgter Kreuzung das Markergen *BAR* auf die Nachkommenschaft übertragen (2.8.6). Über die damit vermittelte Herbizidresistenz konnten nach der Selektion mit dem Herbizid BASTA mehrere resistente Linien isoliert werden (2.2.3; Abb. 5 A). Zusätzlich wurden die heterozygoten Linien der F1-Generation mittels PCR

überprüft. Aus den Nachkommen der durch Selbstung entstandenen F2-Generation wurde die Dreifachmutante *pxa lacs6 lacs7* isoliert. Um die Identifizierung der Dreifachmutante zu vereinfachen (Wahrscheinlichkeit 1:64), wurden die Keimlinge einer Vorselektion unterzogen. Dazu wurde das Saatgut der F2-Generation zunächst auf zuckerfreiem Medium ausgelegt, da sowohl die Transportermutante *pxa1-2* als auch die Acyl-CoA-Synthetase-Mutante *lacs6 lacs7* einen charakteristischen Wachstumsphänotyp auf diesem Medium zeigen (2.2.3). Es ist davon auszugehen, dass Keimlinge mit diesem Phänotyp homozygot im Merkmal *pxa1-2* und/oder *lacs6 lacs7* sind. Es wurden ca. 250 Samen mit einem Mutanten-Phänotyp auf Medium mit Saccharose überführt. Da der exogene Zucker nur während der Keimlingsentwicklung essentiell ist, wurden die Keimlinge nach 10 Tagen Wachstum auf Erde umgesetzt. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte bis zur Samenreife. Durch PCR-Analyse mit isolierter genomischer DNA aus Blättern von 50 Linien der F2 Generation wurden zwei homozygote Dreifach-Mutanten selektiert (2.9.3, 2.5.1). Um zwischen homozygoten und heterozygoten Pflanzen zu unterscheiden, wurde die genomische DNA sowohl auf die Insertion der T-DNA, als auch auf die Präsenz des unveränderten Allels in den Genen *LACS6*, *LACS7* und *PXAI* überprüft. Die Abb. 5 B zeigt für 3 Linien kein PCR-Amplifikat mit genspezifischen Primern für *LACS6* bzw. *LACS7* (L6fow/L6rev; L7fow/L7rev). Dafür erbrachte die Kombination LB-Primer und genspezifischer Primer in allen 3 Linien sowohl für *LACS6* als auch *LACS7* ein PCR-Produkt. Da die PCR-Analyse für das *PXAI*-Gen keine sichere Aussage über die Deletion des Gens erbrachte, wurde darüber hinaus zu verschiedenen Entwicklungsphasen aus einer der isolierten Dreifachmutanten Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (2.10). Die cDNA wurde ebenfalls mit genspezifischen Primern überprüft. Sowohl der Bereich hinter der T-DNA-Insertion (*pxa3601/pxa4014*; 1a) als auch der Bereich, der diese Insertion einschließt (*pxa2071/4014*; 1b), wurde in der Mutante erwartungsgemäß nicht amplifiziert (Abb. 5 C). Die 819 bp große Bande in der Spur 1a ist auf eine Kontamination der cDNA mit chromosomaler DNA zurückzuführen. Als zusätzliche Kontrolle, dass genügend cDNA in den PCR-Ansätzen vorhanden war, wurde diese als Matrize für die Amplifikation von Aktin und *LACS4* eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wurden als Nachweis für die Identifizierung einer homozygoten *lacs6 lacs7 pxa* Mutante gewertet.



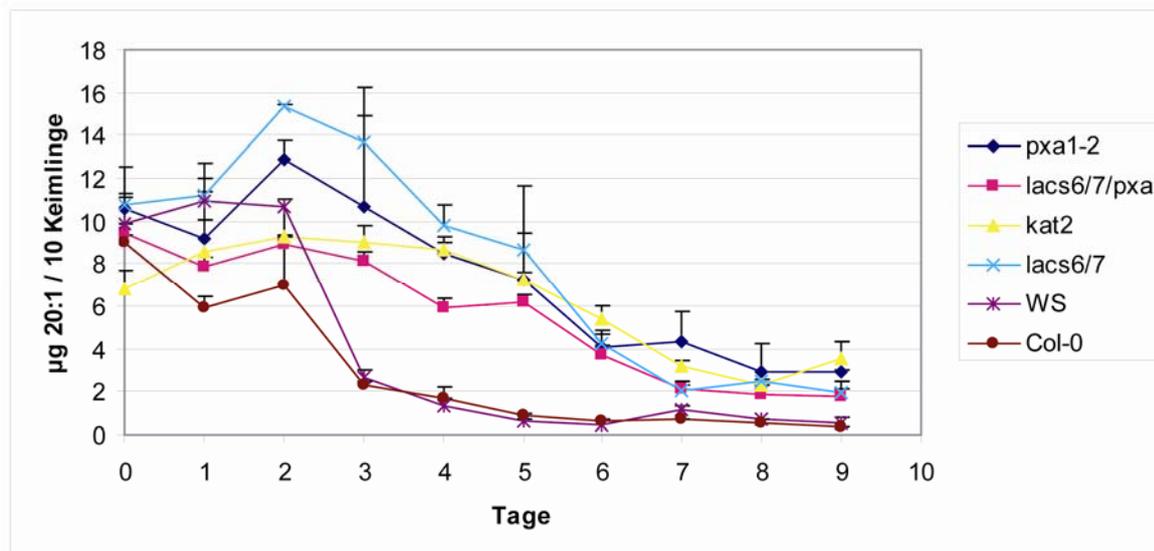
**Abb. 5: Erzeugung (A) und Identifizierung der Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* mittels PCR (B/C).** A: Schematische Darstellung zum experimentellen Ablauf der durch Kreuzung erzeugten Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* in *A. thaliana* (siehe Text). B: Zur Verifizierung der T-DNA-Insertion wurde genomische DNA aus Blättern der drei Transformationslinien 1-3 sowie der Positivkontrolle (*lacs6 lacs7*) und der Negativkontrolle (WS) isoliert. Die nachfolgende PCR-Analyse erfolgte bei gleichzeitiger Anwesenheit von genspezifischen Primern sowie eines Primers, der auf dem linken flankierenden Bereich (left border, LB) der T-DNA hybridisiert. C: Isolierte Gesamt-RNA aus Blattmaterial der Transformationslinie 1 (siehe B) wurde in cDNA umgeschrieben und mit genspezifischen Primern in einer PCR-Reaktion (Spur 1a und 1b) untersucht. Als Positivkontrolle fungierte hierbei der Vektor H1A8 (Spur 2a und 2b) der die cDNA von *PXA1* enthält.

### 3.1.2 Die Mutanten *lacs6 lacs7* und *pxa1-2* komplementieren sich nicht im Transport der Fettsäuren

Zur Untersuchung, ob die Funktionen der peroxisomalen LACS bzw. des ABC-Transporters PXA1 einander komplementieren, wurde der Abbau der Speicherlipide in der Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* im Vergleich zu den Ausgangsmutanten untersucht. Dazu wurde die Menge der TAG-spezifischen Fettsäure Icosensäure (20:1) im Verlauf der Keimung bestimmt. Diese Fettsäure diente somit als Indikator für den TAG-Abbau (Lemieux *et al.*, 1990; Germain *et al.*, 2001). Mit Hilfe der sauren Methanolyse wurde aus Samen und Keimlingen freie und veresterte Fettsäuren extrahiert und in Fettsäuremethylester überführt (2.16). Diese wurden anschließend mit dem Gaschromatographen analysiert (2.17). Als Kontrollen dienten die beiden Ausgangslinien WS und Col-0. Zusätzlich wurde die Thiolase-Mutante *kat2/ped1* mitgeführt. Homozygote *kat2*-Linien sind in ihrer  $\beta$ -Oxidation so stark inhibiert, dass sie auf exogen zugeführte Saccharose während der Keimung angewiesen sind (Hayashi *et al.*, 1998; Germain *et al.*, 2001). Die Lipidkörper der *kat2*-Mutante sind ähnlich zur *pxa1*- als auch *lacs6 lacs7*-Mutante in grünen Kotyledonen sichtbar. Jedoch sind Peroxisomen in der *kat2* Mutante stark vergrößert, was dafür spricht, dass der Transport von Fettsäuren nicht beeinträchtigt ist, aber dafür die nachfolgende  $\beta$ -Oxidation.

In Abb. 6 ist der Abbau der TAG-spezifischen 20:1 in den verschiedenen Linien zu sehen. Es zeigte sich, dass die Abbaurate in der Dreifach-Mutante mit denen der Ausgangslinien vergleichbar ist. Das bedeutet, dass auch die erzeugte Dreifach-Mutante (wie die Ausgangslinien) zu einem stark verzögerten 20:1-Abbau in der Lage ist. In den Ausgangslinien wird die Fettsäure bereits am Tag 3 nach der Aussaat sehr stark abgebaut. Dagegen zeigen alle Mutanten nur eine geringe Abnahme an 20:1. Am Tag 8 gleichen sich die gemessenen Fettsäuremengen an. Die *kat2*-Mutante zeigt ebenfalls einen verlangsamten 20:1-Abbau. Der verlangsamte TAG-Abbau während der Keimung der *kat2*-Mutante ist möglicherweise auf eine teilweise (aufgrund von noch vorhandener Thiolaseaktivität) oder vollständig blockierter  $\beta$ -Oxidation zurückzuführen.

Der Abbau von 20:1 in der Dreifachmutante unterscheidet sich nicht signifikant von den Ausgangslinien, so dass nicht von sich gegenseitig komplementierenden Stoffwechselwegen ausgegangen werden kann. Dieses Ergebnis deutet vielmehr daraufhin, dass es sich bei PXA1 und den beiden peroxisomalen LACS6 und LACS7 um aufeinander folgende Komponenten eines Stoffwechselweges handelt.



**Abb. 6: Abbau der TAG-spezifischen 20:1 während der Keimlingsentwicklung.** Das stratifizierte Saatgut (2 Tage bei 4 °C) von *pxa1-2*, *lacs6 lacs7*, *lacs6 lacs7 pxa* und *kat2* bzw. der Linien WS und Col-0 wurde auf MS-Medium mit 0,5 % Saccharose ausgelegt. Pro Tag wurden 10 Samen bzw. Keimlinge für eine Fettsäurebestimmung (2.16) verwendet. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

### 3.1.3 Untersuchung der $\alpha$ -Oxidation in *lacs6 lacs7 pxa*-Mutante

Aus den Ergebnissen der Fettsäureanalyse im keimenden Samen der erzeugten Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* ist zu entnehmen, dass die Konzentration von 20:1 zwar stark verlangsamt aber dennoch abnimmt (Abb. 6). Es wurde als nächstes untersucht, ob diese Abnahme auf eine verbliebene Transportaktivität von Fettsäuren in die Peroxisomen zurückzuführen ist oder auf einen  $\beta$ -Oxidations-unabhängigen Abbauprozess. Einen solchen alternativen Abbauprozess stellt die  $\alpha$ -Oxidation dar. Aus bisherigen Studien über die physiologische Rolle der  $\alpha$ -Oxidation in Pflanzen ist nur sehr wenig bekannt. Es wird vermutet, dass diesem Prozess eine wichtige Funktion während der Keimung, im Chlorophyllabbau und bei der Pathogenabwehr zukommt (Saffert *et al.*, 2000; Hamberg *et al.*, 1999). Langkettige Fettsäuren werden bei der  $\alpha$ -Oxidation um eine C1 Einheit verkürzt (Saffert *et al.*, 2000). Sollte 20:1 tatsächlich vermehrt über die  $\alpha$ -Oxidation verkürzt werden, so wäre eine Zunahme an 2-Hydroxyfettsäuren sowie ungeradzahligen Aldehyden und Fettsäuren zu erwarten. Es wurde daher nach diesen speziellen  $\alpha$ -Oxidationsintermediaten gesucht. Aus Keimlingen der Dreifachmutante und den entsprechenden Ausgangslinien wurden mit Hilfe der sauren Methanolyse freie und gebundene Fettsäuren in die flüchtigen Methylester überführt (2.16). Anschließend wurden die Hydroxygruppen der Fettsäuremethylestergemische mit BSTFA derivatisiert, für die gaschromatographische

Trennung und die massenspektrometrische Detektion der 2-Hydroxyfettsäuren (2.18). Die Auswertung der Massenspektren von Wildtyp und Mutantenlinien ergab jedoch keinen Hinweis auf eine erhöhte  $\alpha$ -Oxidation in den Mutantenlinien (Daten nicht gezeigt).

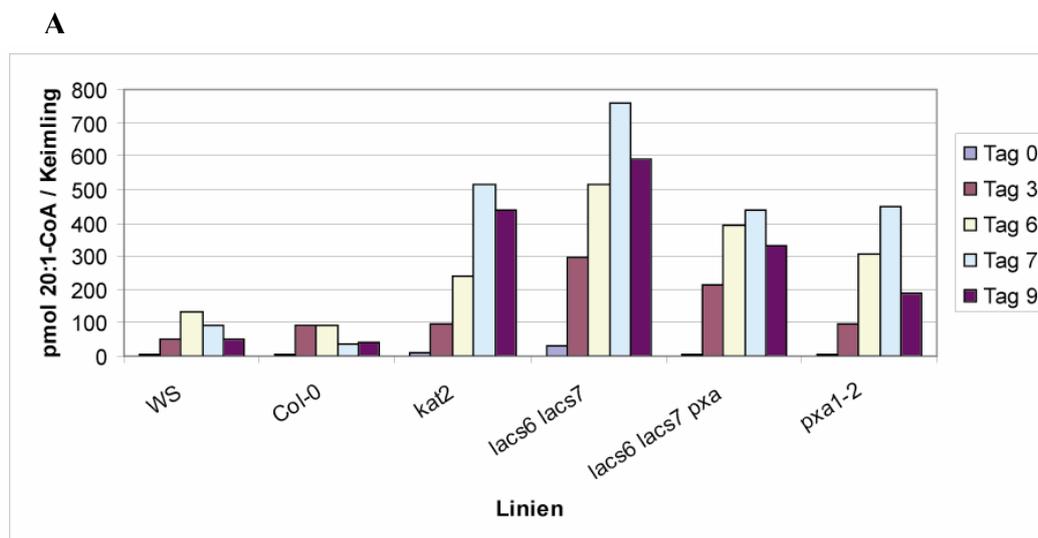
### **3.1.4 Anhäufung von langkettigen Acyl-CoA-Estern während der frühen Keimlingsentwicklung in der *lacs6 lacs7 pxa*-Mutante**

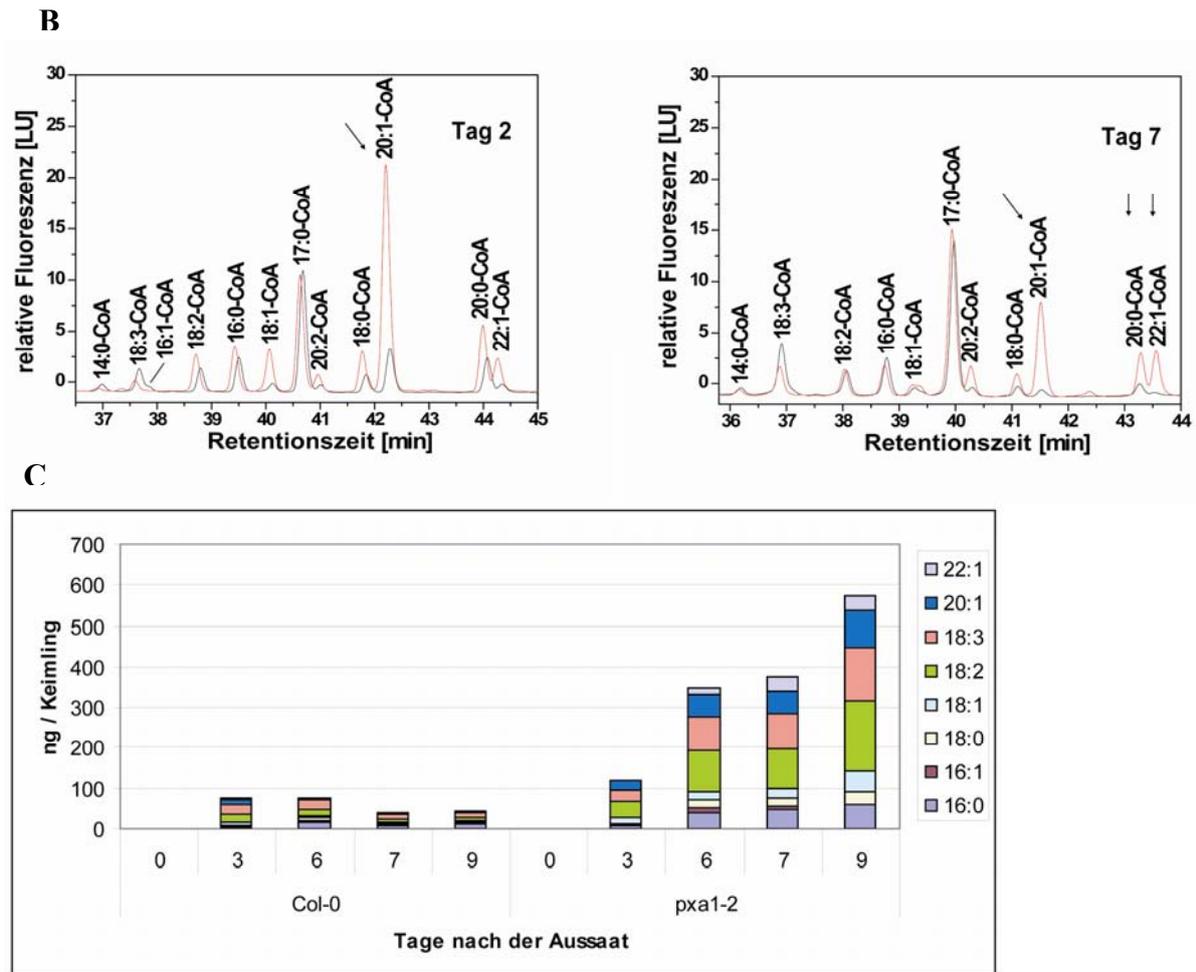
Zur weiteren Charakterisierung der erzeugten Dreifachmutante wurden Acyl-CoA-Esterprofile erstellt. Dazu wurde zunächst eine neue, hoch sensitive Methode zur Quantifizierung von Acyl-CoA-Estern etabliert (2.14). Anschließend wurde aus Samen und Keimlingen der Ausgangslinien WS und Col-0 sowie der Mutanten *lacs6 lacs7*, *pxa1-2*, *lacs6 lacs7 pxa* und *kat2* Acyl-CoA-Ester extrahiert und anschließend derivatisiert (2.13). Die dadurch gebildeten *Etheno*-CoA-Ester wurden durch HPLC aufgetrennt und mittels eines Fluoreszenzdetektors detektiert. In Abb. 7 A sind die Mengen von 20:1-CoA an den Tagen 0, 3, 6, 7 und 9 nach der Aussaat dargestellt. Aus den Vergleichen der Mutanten mit den Kontrollen ist erkennbar, dass in allen Mutanten der Gehalt an 20:1-CoA im Verlaufe der frühen Keimlingsentwicklung ansteigt. Dieser Unterschied wird besonderes an den Tagen 6 und 7 deutlich, wobei die Menge an 20:1-CoA am Tag 9 in allen Mutanten schon wieder abnimmt. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass ein Abbau von 20:1-CoA über die  $\beta$ -Oxidation gestört ist. Auch die  $\beta$ -Oxidationsmutante *kat2* weist eine Anhäufung von 20:1-CoA mit zunehmender Wachstumsdauer auf. Die Daten zeigen, dass eine entweder direkt (*kat2*) oder indirekt (*lacs6 lacs7*, *lacs6 lacs7 pxa*, *pxa1-2*) inhibierte  $\beta$ -Oxidation starke Auswirkungen auf den Acyl-CoA-Ester-Gehalt hat.

Aus den Acyl-CoA-Chromatogrammen in Abb. 7 B ist der bereits beschriebene zunehmende Gehalt an 20:1-CoA erkennbar, aber auch andere lang- und sehr langkettige Fettsäure-CoA-Ester wie 20:0-CoA, 20:2-CoA und 22:1-CoA häufen sich im Verlaufe der Keimlingsentwicklung in der Dreifachmutante an. Am Tag 2 nach der Aussaat ist 20:1-CoA der dominierende Acyl-CoA-Ester sowohl in Col-0 (22 %) als auch in der Dreifachmutante (45 %). Während der prozentuale Anteil von 20:1-CoA am Tag 7 in der Kontrolle nur noch 5 % beträgt, liegt dieser in der Dreifachmutante noch bei 29 %. Die geringfügige Abnahme von 20:1-CoA in der Dreifachmutante korreliert mit der Zunahme an 22:1-CoA. So steigt der prozentuale Gehalt an 22:1-CoA von Tag 2 bis Tag 7 von 7 % auf 14 %. In Col-0 hingegen sind anfänglich (Tag 2) 4 % 22:1-CoA messbar und in der späteren Entwicklung (Tag 7) liegt dieser Gehalt bereits unterhalb der Detektionsgrenze.

Die weitere Analyse der Acyl-CoA-Chromatogramme lässt erkennen, dass auch 18:0-CoA und 18:1-CoA am Tag 2 nach der Aussaat in der Dreifachmutante vermehrt akkumulieren. Dieser Unterschied ist im späteren Entwicklungsverlauf nicht mehr zu erkennen. Für 14:0-, 18:3-, 18:2- und 16:0-CoA ist kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Col-0 messbar. Es ist davon auszugehen, dass die kürzeren Fettsäuren des Speicherlipids ohne den Abbauweg der  $\beta$ -Oxidation direkt als Substrat für die Membranlipidsynthese im sich entwickelnden Keimling dienen.

Zu den bisher vorgestellten Untersuchungen des Acyl-CoA-Gehaltes der Transportermutante *pxa1-2* und Col-0 wurde auch die Menge an freien Fettsäuren während der Keimungsphase überprüft. Interessanterweise ergaben die Vergleiche der Mengen von Col-0 und *pxa1-2* eine starke Akkumulation von freien Fettsäuren in der Mutante (Abb. 7 C). Diese Daten zeigen, dass neben dem Acyl-CoA-Pool auch der Gehalt der freien Fettsäuren durch die reduzierte bzw. ganz unterbrochene  $\beta$ -Oxidation in der Transportermutante *pxa1-2* beeinflusst ist.





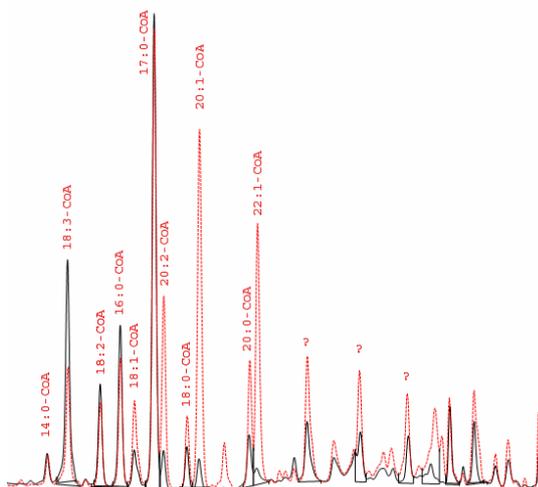
**Abb. 7: Bestimmung von Acyl-CoA-Estern (A/B) und freien Fettsäuren (C) während der Keimlingsentwicklung.** Das stratifizierte Saatgut der Mutantenlinien *pxa1-2*, *lacs6 lacs7*, *lacs6 lacs7 pxa* und *kat2* bzw. von WS und Col-0 wurde auf MS-Medium mit 0,5 % Saccharose ausgelegt. Für die Extraktion der Acyl-CoA-Ester bzw. freier Fettsäuren wurden zwischen 5 und 300 mg Pflanzenmaterial eingesetzt. Durch die Gewichtsbestimmung von jeweils 10 Samen bzw. Keimlingen pro Tag und Linie konnten die Konzentrationen pro Keimling ermittelt werden. **A:** repräsentativer 20:1-CoA-Gehalt pro Keimling **B:** Acyl-CoA-Ester-Chromatogramme am Tag 2 bzw. 7 nach der Aussaat der Wildtypelinie WS (in schwarz) und der Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* (in rot) **C:** repräsentativer Gehalt freier Fettsäuren pro Keimling

### 3.1.5 Erhöhte Biosynthese von sehr langkettigen Acyl-CoA-Estern in *lacs6 lacs7 pxa*

Aus der bereits in Kapitel 3.1.4 vorgestellten Bestimmung der Acyl-CoA-Ester (Abb. 7 B) ist die Akkumulation von langkettigen Acyl-CoAs in der *lacs6 lacs7 pxa*-Mutante während der Keimlingsentwicklung sichtbar. Um die Vermutung zu untermauern, dass die bislang unverstandene verzögerte Abnahme der TAG-spezifischen 20:1-Fettsäure auf eine Fettsäure-Elongation zurückzuführen ist, wurden die Daten erneut mit erweiterten Zeitfenstern ausgewertet. Die Dreifachmutante zeigt im Vergleich zur Ausgangsline WS 9 Tage nach der

Aussaat deutlich erhöhte Werte für sehr langkettige Acyl-CoAs, die vermutlich C24-, C26-, C28-CoAs zuzuordnen sind (Abb. 8). Die genaue Identifizierung der sehr langkettigen CoA-Ester steht allerdings noch aus, da die dafür notwendigen Standards nicht zur Verfügung stehen. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die erhöhten Mengen an sehr langkettigen Acyl-CoA-Estern in der Dreifachmutante nicht nur aufgrund reduzierter bzw. ausbleibender  $\beta$ -Oxidationsaktivität resultieren, sondern auch durch die erhöhte Elongation zu langen und sehr langen Acyl-CoAs.

Die bisherigen Daten zeigen, dass die peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 und LACS7 und der membranständige ABC-Transporter PXA1 Komponenten eines Stoffwechselweges sind. Die genaue Substratspezifität von PXA1 ist dabei noch unklar. Im nächsten Kapitel wird dazu die Bedeutung der zytoplasmatischen LACS untersucht.



**Abb. 8: Bestimmung von Acyl-CoA-Estern mit HPLC.** Aus 9 Tage alten Keimlingen (von MS-Medium mit 0,5 % Saccharose) von WS (in schwarz) und der Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* (in rot) wurden Acyl-CoA-Ester zunächst extrahiert, dann derivatisiert und mittels HPLC aufgetrennt und detektiert.

### 3.2 Bedeutung peroxisomaler LACS vs. zytoplasmatischer LACS in *A. thaliana*

Um Rückschlüsse auf die Substratspezifität des PXA1-Transporters zu ziehen, wurde die Expression der neun LACS-Gene während der Keimlingsentwicklung verfolgt. Unter der Annahme, dass der PXA1-Transporter Acyl-CoAs als Substrat akzeptiert, muss die Fettsäure zuvor von einer zytoplasmatischen LACS aktiviert worden sein. Mit dieser Expressionsstudie sollte überprüft werden, ob zytoplasmatische LACS zum Zeitpunkt des TAG-Abbaus

exprimiert werden. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, ob die gehemmte Keimlingsentwicklung der *lacs6 lacs7*-Mutante auf generell fehlende LACS-Aktivität während dieser frühen Entwicklungsphase zurückzuführen ist.

Für diesen Versuch wurden stratifizierte Samen von WS auf MS-Medium mit 1 % Saccharose ausgelegt und unter Dauerlicht bzw. abgedunkelt zur Keimung gebracht (2.2.3). An den Tagen 0-9 nach der Aussaat wurde die Gesamt-RNA aus dem Pflanzenmaterial isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben (2.10). Diese wurde als Template für eine PCR-Reaktion mit genspezifischen *LACS*-Primern (Sequenzen im Anhang) verwendet. Die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Amplifikate sind in Abb. 9 A dargestellt. Das Expressionsprofil zeigt, dass *LACS7* bereits zum Zeitpunkt der Aussaat exprimiert wurde. *LACS6* wurde zu diesem Zeitpunkt ebenfalls exprimiert, jedoch in einem wesentlich schwächeren Ausmaß. Am Tag 1 nach der Aussaat sind auch die Amplifikate der zytoplasmatischen *LACS1*, *LACS2* und *LACS4* sichtbar. Das bedeutet, dass bereits zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt zytoplasmatische LACS in der Zelle präsent sind. Etiolierte Keimlinge weisen eine vergleichsweise leicht erhöhte Transkriptmenge auf.

Das gewebespezifische Expressionsmuster der *LACS*-Gene wurde mit einem ausgewählten Set von Microarrays (Affymetrix GeneChips®) verglichen. Für die computergestützte Darstellung der Expressionsstärke eines Genes wurde auf folgende Datenbank zurückgegriffen: <http://geneinvestigator.eth.ch> (Abb. 9 B). Die RT-PCR-Daten stimmen größtenteils mit den Microarray-Daten überein. Auffallend ist jedoch die Diskrepanz in der Expressionsstärke von *LACS6*. Die schwache Intensität der Banden in der RT-PCR-Analyse ist möglicherweise auf die relativ geringe Anzahl von PCR-Zyklen (27) zurückzuführen. Diese Zyklenzahl wurde so gewählt, um den Unterschied in der Expressionsstärke der einzelnen Gene besser hervorzuheben.

Da für die Proteine *LACS1* und *LACS4* bereits Aktivität für die Speicherlipid-spezifische Fettsäure 20:1 gezeigt wurde (Shockey et al., 2002), könnten die beim Abbau der Speicherlipide frei werdenden Fettsäuren im Zytoplasma durch zytoplasmatische LACS aktiviert werden und somit als Acyl-CoA von dem PXA1-Transporter transportiert werden. Somit kann das Substrat für den Transporter nicht eingegrenzt werden. Es kann sowohl die freie, als auch die aktivierte Fettsäure als Substrat dienen. Die arretierte Keimlingsentwicklung der *lacs6 lacs7*-Mutante kann wahrscheinlich nicht auf eine generell fehlende LACS-Aktivität während der Keimlingsentwicklung zurückgeführt werden.



### 3.3 Expressionsanalyse des PXA1 Transporters und der peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetase LACS7 in verschiedenen Wachstumsstadien

Durch den Einsatz des Reportergens  $\beta$ -Glucuronidase (*GUS*) bestand die Möglichkeit die Promotoraktivität der *PXA1*- und *LACS7*-Gene und damit die gewebespezifische Expression zu untersuchen (2.11). Das *GUS*-Gen kodiert für ein 68 kDA großes Protein, welches aus dem *E. coli*-*GUS*-Operon stammt und den Umsatz von  $\beta$ -Glucoroniden und  $\beta$ -Galakturoniden katalysiert. Die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Glucoronidase lässt sich im Gewebe der Pflanze histochemisch mittels Farbreaktion nachweisen, wobei das Substrat 5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronid (X-Gluc) zu einem schwer löslichen Indigo-Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4-dichlor-Indigo umgesetzt wird, der an den Orten der Enzymaktivität ausfällt.

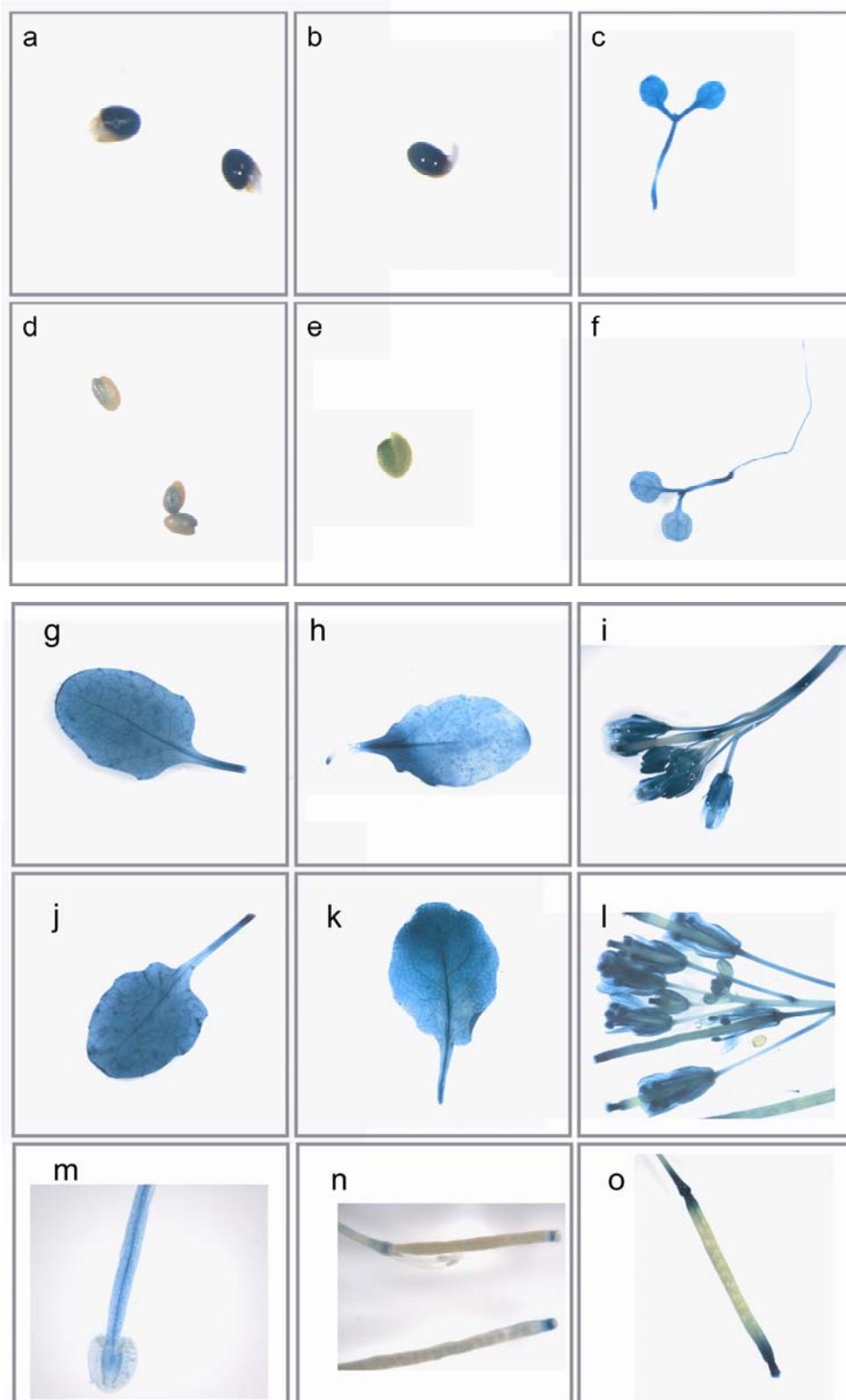
Um die gewebespezifische Regulation der Gene *PXA1* und *LACS7* auf Transkriptebene zu untersuchen, wurden zuerst Fusionskonstrukte aus dem nativen *PXA1*- bzw. *LACS7*-Promotor und dem *GUS*-Gen in dem Pflanzentransformationsvektor pCAMBIA mit dem Selektionsmarker Hygromycin erzeugt (2.11.1). Anschließend wurden diese Plasmide für eine Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt (2.8.4). Über die rekombinanten Agrobakterien erfolgte die zufällige Insertion des Fusionskonstruktes in das Genom von *A. thaliana* Col-0. Um auszuschließen, dass möglicherweise ein essentielles Gen von dieser Insertion betroffen wurde, wurden jeweils sechs unabhängig transformierte Linien für die Expressionsanalyse eingesetzt. Das transgene Saatgut wurde auf MS-Medium mit Saccharose und Hygromycin ausgelegt (2.2.3). Damit konnten sich nur Keimlinge etablieren, die erfolgreich transformiert wurden. Zu verschiedenen Entwicklungsstadien wurden Keimlinge und bestimmte Pflanzenorgane der histochemischen Färbung unterzogen (2.11.2). Die Färbung der Gewebe wurde unter dem Binokular betrachtet und fotografiert. In Abb. 10 a-f ist die Analyse der *PXA1::GUS*- und *LACS7::GUS*-Pflanzen während der Keimung und der frühen Keimlingsentwicklung zu sehen. Beide Promotoren zeigen eine starke Aktivität im Samen während der Keimung (Abb. 10 a, d), wobei *LACS7::GUS*-Samen eine stärkere Färbung aufweisen. Die mit der Beendigung der Keimung hervortretende Wurzelspitze weist eine vergleichsweise schwache Färbung in beiden Linien auf. Am Tag 4 nach der Aussaat (Abb. 10 c, f) ist die Blaufärbung im Bereich der Kotyledonen erkennbar. Dabei ist eine besonders starke Promotoraktivität sowohl von *LACS7* als auch *PXA1* im Leitgewebe zu erkennen und darüber hinaus im Hypokotyl der Keimlinge. Die Wurzelfärbung ist während der Keimlingsentwicklung in den *PXA1::GUS*-Linien sichtbar stärker. Der Aktivitätsunterschied der Promotoren in den Wurzeln deutet an, dass *PXA1* möglicherweise

für seine Transportaktivität die Funktion von *LACS7* nicht benötigt. Im weiteren Verlauf der Keimlingsentwicklung ist die Abnahme der *GUS*-Expression in den Kotyledonen und ersten Blättern für beide Linien identisch (Daten nicht gezeigt).

Das Expressionsmuster von *PXA1::GUS*- und *LACS7::GUS*-Linien in ca. einem Monat alten Keimlingen (2-4 Blattstadium) ist ebenfalls sehr ähnlich. Ihre Aktivität wurde in den Rosettenblättern, dem Hypokotyl und der Wurzel beobachtet, wobei die stärkste Aktivität im vakulären Gewebe auftrat (Daten nicht gezeigt).

Während der Blütenentwicklung und der Phase nach der Befruchtung sind *PXA1*- und *LACS7*-Promotoraktivität ebenfalls nachweisbar, wie diese Studie zeigt. Die Abb. 10 i und l zeigt verschiedene Blütenstadien von *PXA1::GUS*- bzw. *LACS7::GUS*-Linien. Diese Linien exprimierten das *GUS*-Gen in den Kelch- und Kronblättern und zusätzlich besonders intensiv in den Bereichen der Narbe und des Blütenbodens. Auch die männlichen Blütenorgane wiesen  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität auf. Ein *LACS7::GUS*-exprimierendes Staubblatt mit reifen Pollenkörnern im Staubbeutel ist in Abb. 10 m dargestellt. Da das Leitgewebe des Staubfadens und der Bereich des Konnektivs, in dem Leitbündel verlaufen, stärker angefärbt sind, könnte *LACS7* in der Nährstoffversorgung der Pollensäcke eine Rolle spielen. Im anschließenden Entwicklungsstadium der Samenentwicklung konnte *GUS*-Aktivität nur an der Spitze der Schote und am Schotenansatz nachgewiesen werden (Abb. 10 n, o). Die sich entwickelnden Samen wiesen dabei keine Färbung auf. Auch in reifen Schoten, die zum Teil schon geöffnet vorlagen, war keine Blaufärbung der Samen sichtbar (Daten nicht gezeigt). Dies deutet daraufhin, dass für die Entwicklung des Samens weder die Funktion von *LACS7* noch von *PXA1* benötigt werden könnte.

In seneszenten Blattgewebe erfolgt erneut ein starker Abbau von Fettsäuren über die  $\beta$ -Oxidation. Somit konnte die Expression des *GUS*-Gens unter der Kontrolle des *LACS7*- bzw. *PXA1*-Promotors beobachtet werden (Abb. 10 h, k). Der genaue Vergleich der Expressionsmuster zeigt jedoch eine etwas schwächere *GUS*-Aktivität für den *LACS7*-Promotor auf. Analysen des ‚Geneinvestigators‘ (<http://geneinvestigator.eth.ch>) bestätigen diese vergleichsweise schwächere Expression von *LACS7*, zeigen aber, dass im Gegenzug die peroxisomale *LACS6* in diesem Stadium die gleiche Expressionsstärke von *PXA1* aufweist. Damit wird das Zusammenwirken von *PXA1* und peroxisomalen *LACS* im Rahmen des Fettsäureabbaus bestätigt. Die Promotoranalyse zeigt, dass insgesamt das Expressionsmuster der beiden Gene sehr ähnlich ist.

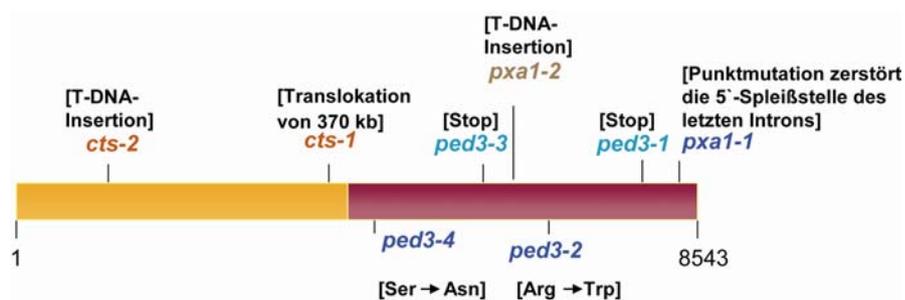


**Abb. 10: Histochemische Visualisierung der GUS-Aktivität in *LACS7::GUS*- bzw. *PXA1::GUS*-transgenen Linien.** Keimungs- und frühe Nachkeimungsphase (a-f), *LACS7* a-c und *PXA1* d-f; junge (g, j) und seneszente (h, k) Blätter, *LACS7* g, h und *PXA1* j, k; verschiedene Blütenstadien *LACS7* (i) und *PXA1* (l); Staubblatt *LACS7* (m); reife Schoten *LACS7* (n) und *PXA1* (o). Es sind repräsentative Aufnahmen von sechs unabhängigen *LACS7::GUS*- bzw. *PXA1::GUS*-Transformationslinien dargestellt.

### 3.4 Untersuchungen zum Keimungsphänotyp von PXA1

Eine Gemeinsamkeit aller bisher beschriebenen Transportermutanten von PXA1 ist, dass diese unter natürlichen Bedingungen nicht lebensfähig sind. Sie sind nicht in der Lage, sich als Keimlinge zu etablieren. In Abhängigkeit von der Lage und der Art der Mutation innerhalb des *PXA1* Gens wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Keimungsphänotypen beschrieben (Russell *et al.*, 2000; Zolmann *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2002; Footitt *et al.*, 2002). Die Allele *cts-1* und *cts-2* weisen dabei den stärksten Phänotyp auf. Die Samen dieser Linien sind nicht in der Lage zu keimen. Auch eine Ergänzung des Mediums mit Zucker verhilft diesen Linien nicht zur Keimung. Die Samen sind nur durch eine mechanische Öffnung der Samenschale befähigt zu keimen (Footitt *et al.*, 2002). Die *ped3-3* und die *ped3-1* Mutanten zeigen ebenfalls einen Dormanzphänotyp, der jedoch durch die Supplementierung des Wachstumsmediums mit Zucker überwunden werden kann (Hayashi *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu keimen die *ped3-2*, *ped3-4* bzw. *pxa1*-Mutanten auch ohne Zugabe von Zucker und sind erst in der darauf folgenden Keimlingsentwicklung inhibiert (Zolmann *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2002).

Interessanterweise befinden sich Mutationen (*ped*, *pxa*), die den Dormanzphänotyp in Gegenwart von Zucker nicht zeigen, ausschließlich in der zweiten Hälfte des Gens. Die mit *cts* bezeichneten Mutationen hingegen befinden sich beide in der ersten Hälfte des Gens, das für den ersten Halbtransporter kodiert (Abb. 11). Die *ped* bzw. *pxa* Mutanten könnten zwar keinen vollständigen ABC-Transporter synthetisieren, sehr wohl aber ein Protein, das einem ABC-Halbtransporter entspräche. In diesem Falle könnte dieser Halbtransporter, möglicherweise als Dimer, die Aufgaben erfüllen, die für das Brechen der Dormanz (in der Gegenwart von exogenem Zucker) benötigt werden. Diese Funktion würde sich also von der Funktion als Transporter für Fettsäuren unterscheiden. Sollte diese Hypothese zutreffen, ließen sich also diese sehr unterschiedlichen Aufgaben des Proteins bestimmten Sequenzabschnitten zuordnen.



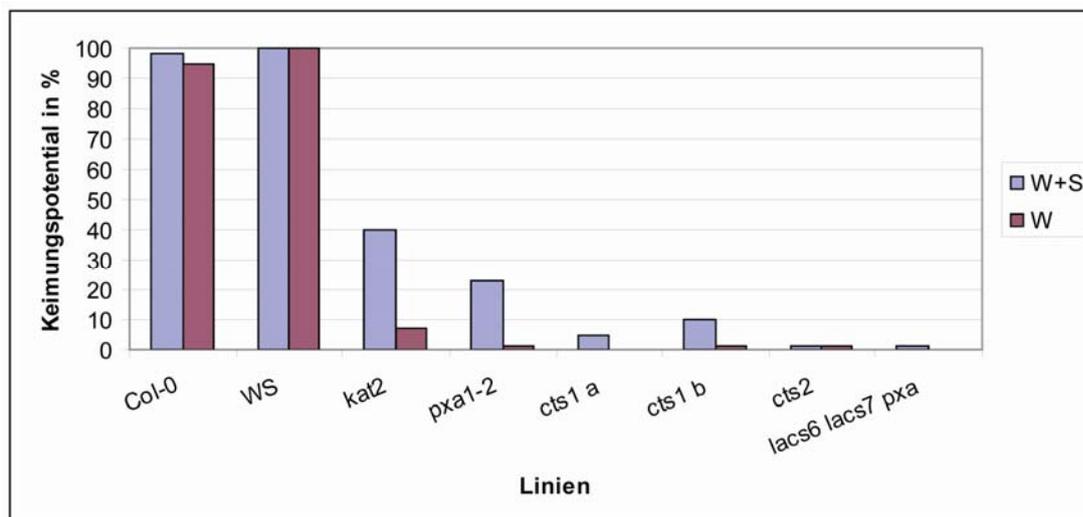
**Abb. 11:** Schematische Darstellung des *PXA1*-Gens mit verschiedenen Mutationen und den resultierenden Namen der Mutanten.

Um die Hypothese zu überprüfen, wurde das Keimungsverhalten der verschiedenen Transporter-Mutanten untersucht. Dazu wurde zunächst die Keimungsfähigkeit der *cts1*- bzw. *cts2*-Linien getestet. Allen mehrfach durchgeführten Keimungsversuchen ging zunächst eine Stratifizierung der Samen voraus, um eine gleichmäßige Keimung anzuregen. Dazu wurden die Samen oberflächensterilisiert und anschließend für mindestens zwei Tage in sterilem Wasser bei 4°C inkubiert (2.2.2). Es stellte sich heraus, dass sich die Keimungsfähigkeit des Saatgutes von *cts1* und *cts2* mit der Zeit veränderte. Während anfänglich nur ca. 18 % der *cts1*- und 8 % der *cts2*-Samen in der Lage waren auf MS-Medium in der Gegenwart von Zucker zu keimen, lag die Keimungsrate nach zwei Jahren trockener Lagerung bei Raumtemperatur (nicht abgedunkelt) bereits bei 67 % für *cts1* und 38 % für *cts2* (2.2.3). Für die Keimung der Samen war es nicht notwendig die Samenschale mechanisch zu beschädigen. Außerdem waren von den 67 % der gekeimten *cts1*-Samen nur 41 % in der Lage sich als Keimling zu etablieren. Im Fall von *cts2* konnten sich trotz der Präsenz von Zucker im Wachstumsmedium von den 38 % der gekeimten Samen nur 19 % als Keimlinge etablieren. Einige Keimlinge bildeten sogar die ersten Blätter aus, aber dafür keine Wurzel oder ihre Entwicklung wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt inhibiert. Das Keimungsverhalten des in dieser Studie getesteten Saatgutes war außerdem generationsabhängig. Dabei unterscheidet sich das Keimungsverhalten von *cts1* und *cts2* deutlich zu den bereits publizierten Daten über die Keimungsfähigkeit dieser beider Linien in Gegenwart von Zucker (Footitt *et al.*, 2002). Obwohl daraufhin gewiesen werden muss, dass in der Publikation keine genauen Angaben zur Zusammensetzung des Mediums gemacht wurden. Die ebenfalls untersuchte *pxa1-2*-Mutante zeigte ein ähnliches Keimungsverhalten. Auf MS-Medium in der Gegenwart von Zucker konnten durchschnittlich 65 % der Samen keimen. Nach unseren Daten unterscheidet sich die Keimungsfähigkeit der Transportermutanten mit einer Mutation im potentiellen ersten Halbtransporter nicht von den Linien, die ihre Mutation in der zweiten Hälfte des Proteins tragen. Somit waren die ursprünglich geplanten Komplementierungsversuche der *cts1*-Mutante mit unterschiedlich langen N-terminalen Fragmenten des PXA1 Transporter nicht mehr sinnvoll.

Da MS-Medium Inhaltsstoffe enthält, welche keimungsfördernd wirken könnten, wurde eine weitere Keimungsstudie (Abb. 12) auf Wasseragar mit und ohne Saccharose-Zusatz durchgeführt. Damit sollte der Einfluss der MS-Mischung auf das Keimungsverhalten der Mutanten überprüft werden. Auch in dieser Studie wird die Aussage verdeutlicht, dass der Keimungsphänotyp nicht von der Lage der Mutation innerhalb des Gens abhängt. Als Kontrollen wurden die Linien WS und Col-0 verwendet. Neben den Transportermutanten *cts1*

(a-Originalsaatgut; b-Erntezeitpunkt 13.09.04), *cts2* und *pxa1-2* wurden als zusätzliche Keimungsmutanten *kat2* und *lacs6 lacs7 pxa* untersucht. Auf Wasseragar ohne Zucker waren bis auf die Kontrollen Col-0 und WS alle weiteren Linien nachhaltig in ihrer Keimungsfähigkeit beeinträchtigt. Das Keimungspotential der verschiedenen Transportermutanten wurde durch die Gegenwart von Saccharose nur leicht erhöht. Die *kat2*-Mutante zeigte dabei mit 40 % die höchste Keimungsfähigkeit. Das Keimungspotential der verschiedenen Transportermutanten unterscheidet sich nicht signifikant in Gegenwart von Saccharose, wobei die Abweichungen sich im natürlichen Schwankungsbereich befinden, welcher abhängig von der Qualität des Saatgutes ist. Die auf diesem Medium ermittelte Keimungsrate für *cts1* und *cts2* stimmte mit den publizierten Daten überein (Footitt *et al.*, 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten Transportermutanten in Abwesenheit von Saccharose die Samenruhe nicht überwinden können und damit die essentielle Rolle des Transporters während der Keimung unterstrichen wird. Da auf Wasseragar mit Saccharose-Zusatz vergleichsweise weniger *cts1*-, *cts2*- bzw. *pxa1-2*-Samen keimten, als auf dem Saccharose-haltigem MS-Medium, zeigen diese Daten, dass die Keimungsbereitschaft der Transportermutanten in Gegenwart von Saccharose entscheidend von der Zusammensetzung des Wachstumsmediums abhängt.



**Abb. 12: Keimungsstudie auf Wasseragar in An- und Abwesenheit von Saccharose.**

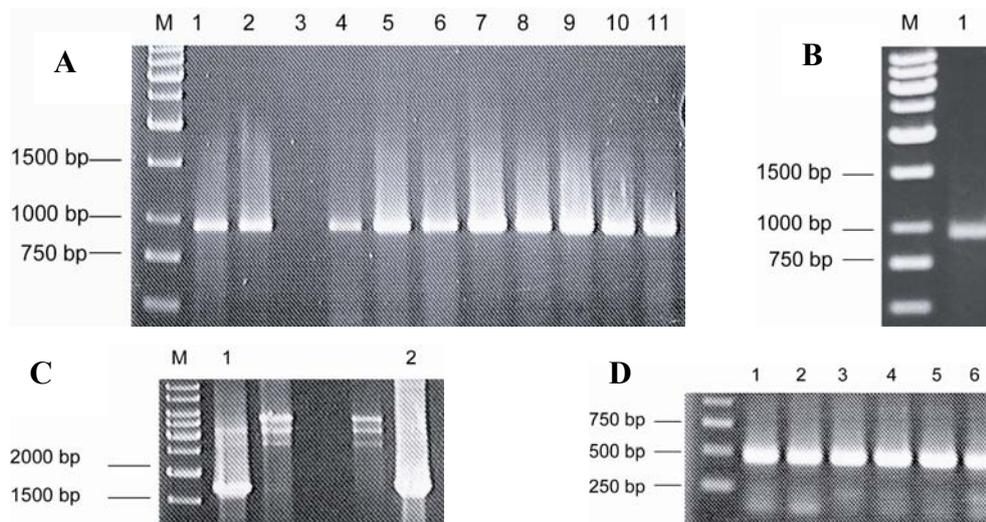
Saatgut wurde oberflächensterilisiert und für 2 Tage bei 4 °C stratifiziert. Anschließend wurde das Saatgut auf Wasseragar (W) (7 g Mikroagar/l Wasser, pH 6.0) bzw. Wasseragar mit 0,5 % Saccharose (W+S) ausgelegt und unter Dauerlicht bei 24 °C inkubiert. Nach 4 Tagen wurde die Keimfähigkeit der Samen überprüft. Von den mehrfach durchgeführten Keimungsversuchen stellt die Abbildung ein repräsentatives Ergebnis dar.

### 3.5 Interaktion zwischen PXA1 und LACS6/LACS7

Für ein besseres Verständnis des Transportprozesses ist es wichtig zu bestimmen, ob direkte und spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen peroxisomalen LACS und dem ABC-Transporter PXA1 für den Import der Fettsäuren in die Peroxisomen essentiell sind. Da es sich bei PXA1 und LACS um membranständige Proteine handelt, ist der Nachweis einer Interaktion mit dem klassischen Yeast-2 Hybrid-System eingeschränkt. In dieser Arbeit wurde deshalb ein Experiment durchgeführt, bei dem die Abwesenheit direkter Protein-Interaktionen überprüft wurde. Es wurde versucht, die *lacs6 lacs7* Mutante mit anderen normalerweise nicht peroxisomalen LACS zu komplementieren. Dazu sollte das Acyl-CoA-Synthetase-Gen aus *E. coli* *EcACS (fadD)* und das zytoplasmatische *LACS4* Gen aus *A. thaliana* synthetisch mit einem peroxisomalen Lokalisierungssignal versehen und unter der Kontrolle des *LACS7*-Promotors exprimiert werden. Eine erfolgreiche Komplementation würde auf eine fehlende direkte Protein-Protein-Wechselwirkung hindeuten, da *EcACS* und *AtLACS4* die für diese Wechselwirkung notwendigen Sequenzmotive mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht aufweisen. Umgekehrt wäre eine ausbleibende Komplementation als Hinweis auf eine über die reine LACS-Aktivität hinausgehende Eigenschaft der pflanzlichen peroxisomalen LACS-Proteine zu werten.

Die beiden nicht peroxisomalen *LACS*-Gene wurden dazu zusammen mit dem *LACS7*-Promotor in den Pflanzentransformationsvektor pCAMBIAM kloniert (Klonierung, Abb. 30, 32). Als Positivkontrolle für diesen Versuch wurde das peroxisomale *AtLACS7*-Gen verwendet, das den *lacs6 lacs7*-Phänotyp komplementieren sollte. Nach der Transformation von *Agrobakterien* (2.8.4) mit den drei erstellten Plasmiden, wurden die nun rekombinanten *Agrobakterien* für eine Transformation von *lacs6 lacs7*-Pflanzen eingesetzt (2.8.5). Das erhaltene Saatgut wurde auf Saccharose-haltigem MS-Medium mittels Hygromycin selektiert (2.2.3). Die auf diesem Medium etablierten Transformanten wurden nach ca. 2 Wochen auf Erde transferiert und zur Samenreife gebracht. Es konnten auf diese Weise 10 Linien *lacs6 lacs7 EcACS-SKL*; 1 Linie *lacs6 lacs7 AtLACS4-SKL* und 50 Linien *lacs6 lacs7 AtLACS7* isoliert werden. Um die Insertion der Gene auch auf DNA-Ebene zu untersuchen, wurde aus unabhängig transformierten Linien genomische DNA aus Blättern isoliert (2.9.3). Diese wurde als Matrize für eine PCR-Reaktion eingesetzt (2.5.1). Die Insertion der cDNA der Gene *EcACS-SKL*, *AtLACS4-SKL* und *AtLACS7* konnte somit für viele Linien bestätigt werden (Abb. 13). Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Gene auch tatsächlich exprimiert wurden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Blättern isoliert und die RNA als Matrize für eine cDNA-Synthese verwendet (2.10). Mit genspezifischen Primern konnten alle drei Gene

nachgewiesen werden (Abb. 13). Um die Gefahr einer Kontamination der cDNA mit genomischer DNA zu verhindern, wurde die isolierte RNA einer DNase-Behandlung unterzogen. Somit konnte die Expression von *EcACS-SKL* und *AtLACS7* im Hintergrund der *lacs6 lacs7*-Mutante nachgewiesen werden. Da *AtLACS4-SKL* sich nur am 3'-Ende vom endogenen *LACS4*-Transkript unterscheidet, konnte die Expression der beiden Gene mittels RT-PCR nicht unterschieden werden.



**Abb. 13: Überprüfung der Retransformanten: *lacs6 lacs7 EcACS-SKL*, *lacs6 lacs7 AtLACS4-SKL* und *lacs6 lacs7 AtLACS7* mittels PCR. A:** Isolierte genomische DNA von 11 unabhängig transformierten *lacs6 lacs7 EcACS-SKL* Linien wurde für eine PCR-Reaktion mit den Primern ECS1 und ECrSKL eingesetzt. **B:** RT-PCR, *EcACS-SKL*-Transkript wurde mit den Primern ECS1 und ECrSKL amplifiziert. **C:** Isolierte genomische DNA der Retransformante *lacs6 lacs7 AtLACS4-SKL* (Spur 1) und die als Positivkontrolle verwendete Plasmid-DNA pGEM11P7LACS4-SKLT (Spur 2) wurden unter Verwendung der Primer L4f1264 und L4re5021 mittels PCR überprüft. **D:** Die cDNA von 6 unabhängigen Transformationslinien *lacs6 lacs7 AtLACS7* wurde in einer PCR-Reaktion mit den Primern L7fow und L7rev überprüft.

Im nächsten Schritt wurden die transgenen Linien auf ihre Keimungsfähigkeit auf MS-Medium ohne Saccharose getestet. Es zeigte sich dabei ein unerwartetes Ergebnis. Die als Positivkontrolle verwendete cDNA des *AtLACS7*-Gens, unter der Kontrolle des endogenen Promotors, war nicht in der Lage den *lacs6 lacs7*-Phänotyp zu komplementieren. Ebenso waren die Proteine *AtLACS4-SLK* und *EcACS-SKL* zu dieser Komplementation nicht in der Lage (Abb. 14). Die Plasmid-DNA des *AtLACS7*-Gens wurde erneut sequenziert und erwies sich als fehlerfrei. Die Studien an *LACS7::GUS*-Linien zeigten, dass der *LACS7*-Promotor während der Keimungsphase aktiv war (3.3) und damit eine Fehlfunktion des Promotors ausgeschlossen werden kann. Die Expression von *AtLACS7* wurde zusätzlich mittels RT-PCR

im frühen Keimlingsstadium (auf MS-Medium mit Saccharose) überprüft und ein Transkript konnte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die nicht erfolgte Komplementation der *lacs6 lacs7* Mutante mit der cDNA von *AtLACS7* stellt ein überraschendes Ergebnis dar, da beide Einzelmutanten keinen Keimungsphänotyp aufweisen. Es ist daher sehr schwierig eine Erklärung für die fehlende Komplementation zu finden. Möglicherweise sind in der genomischen DNA von *LACS7* zusätzliche regulatorische-Elemente in den Intronbereichen oder außerhalb des verwendeten Promotors lokalisiert. In einem weiteren Experiment bleibt zu klären, ob die genomische DNA von *LACS7* in der Lage ist, den *lacs6 lacs7*-Phänotyp zu komplementieren.



**Abb. 14 Keimungsverhalten der erzeugten Retransformanten auf MS-Medium.**

Das Saatgut von 10 unabhängigen Transformationslinien von *lacs6 lacs7 EcACS-SKL* (a) bzw. *lacs6 lacs7 AtLACS7* (c) und einer *lacs6 lacs7 AtLACS4-SKL*-Linie (b) wurde auf MS-Medium unter Dauerlichtbedingungen kultiviert. Alle Linien wiesen den *lacs6 lacs7*-Phänotyp auf. Die Aufnahmen zeigen jeweils einen repräsentativen Keimling jeder Linie.

Parallel zu den beschriebenen Versuchen wurde überprüft, ob das *EcACS-SKL*-Protein auch tatsächlich in den Peroxisomen lokalisiert ist. Zu diesem Zweck wurde ein Fusionskonstrukt mit einer Variante des ‚enhanced Yellow Fluorescent‘ Proteins (EYFP) hergestellt. Das *EcACS-SKL*-Gen wurde mit den Primern *ecACSfEYFP* und *ecACSrEYFP* amplifiziert und als *NotI*-Fragment in das pCAT-EYFP-Plasmid ligiert. *EcACS-SKL* ist dabei C-terminal an EYFP fusioniert. Die Expression des Fusionsproteins stand unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden 35S-Promotors. Das Plasmid wurde für die Transformation von Zwiebel-Epidermiszellen eingesetzt (2.8.7). Zur transienten Expression des Fusionsproteins wurden die Zellen nach der Transformation ca. 24 h inkubiert und anschließend unter Verwendung eines Fluoreszenz-Mikroskopes untersucht. Die Lokalisation von EYFP-*EcACS-SKL* konnte in den Peroxisomen nachgewiesen werden (Abb. 15). In einer parallelen Transformation der Zellen mit dem peroxisomalen Marker *gMDH-ECFP* (Fulda *et al.*, 2002) konnte die Lokalisation von EYFP-*EcACS-SKL* verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Somit kann der *lacs6 lacs7*-Mutantenphänotyp der *lacs6 lacs7EcACS-SKL*-Retransformante nicht auf eine mögliche Fehllokalisierung des *EcACS-SKL*-Proteins zurückgeführt werden. Die Schlussfolgerung, dass eine fehlende Proteininteraktion zwischen *EcACS-SKL* und PXA1 die Etablierung des Keimlings verhindert hat, kann jedoch aufgrund der fehlenden Komplementation der *lacs6 lacs7AtLACS7* Retransformante (Positivkontrolle) nicht gezogen werden.

Die aus diesem Experiment gewonnenen Daten lassen keine Aussagen über eine mögliche Interaktion zwischen PXA1 und den beiden peroxisomalen LACS zu. Weitere Hinweise zur Beantwortung der Frage, ob die Interaktion zwischen PXA1-Transporter und peroxisomalen LACS für den Transport der Fettsäuren notwendig ist, wurden durch Liposomen-Transportversuche gewonnen (3.7.2).



**Abb. 15: Subzelluläre Lokalisation von EYFP-*EcACS-SKL* in Zwiebelepidermiszellen (*Allium cepa* L.).** Für die Lokalisierung von EYFP-*EcACS-SKL* wurden Zwiebelepidermiszellen mittels der Partikel-Bombardment-Methode transformiert (2.8.7). Die von EYFP ausgehende Fluoreszenz konnte mit einem speziellen Filter im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz ist dabei auf die Peroxisomen beschränkt. Der Maßstab entspricht 50 µm.

### 3.6 Transportstudien an intakten Glyoxysomen

#### 3.6.1 Fettsäuretransport in Glyoxysomen aus *A. thaliana* und *R. communis* L.

Für die Charakterisierung des PXA1-Transporters ist es notwendig seine Substratspezifität aufzuklären. Zunächst wurde versucht, aus etiolierten *A. thaliana*-Keimlingen der Linien WS und *pxa1-2* Glyoxysomen zu isolieren und diese in Gegenwart von radioaktiv markierter langkettiger Fettsäure bzw. Acyl-CoA-Ester zu inkubieren. Es sollte damit die zeitabhängige Substrataufnahme durch intakte Glyoxysomen verfolgt werden. Für die Isolierung der Glyoxysomen wurden Protokolle der Arbeitsgruppe Nishimura aus Japan modifiziert (2.22.1).

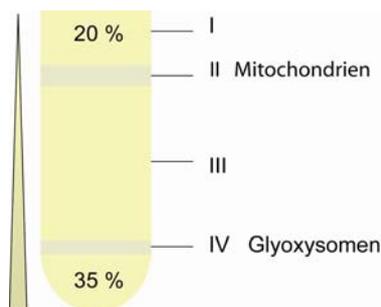
Zur Optimierung wurde der Rohextrakt zum einen durch Zentrifugation konzentriert und zum anderen sofort mit den radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Ansätze auf einen Percoll-Gradienten geladen und für 30 min bei 100000 x g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Damit sollte die Trennung der Organellen erfolgen und gleichzeitig die Abtrennung der nicht aufgenommenen markierten Substrate. Nach der Zentrifugation war mit bloßem Auge nur eine Bande im oberen Teil des Gradienten sichtbar (Fraktion II, Abb. 16). Die Glyoxysomenfraktion wurde jedoch kurz vor dem Boden des Gradienten erwartet (Fraktion IV, Abb. 16). Bei einigen Präparationen konnte man auch im unteren Bereich des Gradienten schwache Banden sehen. Aus unterschiedlichen Fraktionen des Gradienten wurden Aliquots entnommen und die Radioaktivität durch Szintillationszählung bestimmt. Durch zusätzliche Messung des Enzyms Malat-Synthase erfolgte die Zuordnung der Glyoxysomen (2.24.1). Die Auswertung der Malat-Synthase-Aktivität ergab, dass ein Großteil der ursprünglichen Aktivität im Rohextrakt während des Transportexperiments und nachfolgender Zentrifugation verloren ging und darüber hinaus, dass die Malat-Synthase-Aktivität nicht in der vermuteten Glyoxysomenfraktion nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Glyoxysomen nicht ausreichend von den anderen Zellorganellen zu trennen waren bzw. die Glyoxysomen nicht mehr intakt waren. In einem Western-Blot wurden die Daten des Enzymtests bestätigt (2.12.6). Das für Glyoxysomen spezifische Enzym Isocitrat-Lyase war nur in der Fraktion II des Gradienten nachweisbar (Daten nicht gezeigt). In der Fraktion II war durchschnittlich eine 10-fach höhere Konzentration an Acyl-CoA-Estern im Vergleich zu freien Fettsäuren messbar. Die Deletion des Transportergens *PXA1* hatte dabei keinen Einfluß auf den Transport der Substrate. In der erwarteten Glyoxysomen-Fraktion (IV) war jedoch die gemessene Radioaktivität an  $[1-^{14}\text{C}]-18:1$  bzw.  $[1-^{14}\text{C}]-18:1\text{-CoA}$  so gering, dass keine sicheren Aussagen über den Transport der Substrate in die Glyoxysomen getroffen werden konnte.

Es wurde nun versucht eine Methode zur Durchführung von Transportversuchen mit Glyoxysomen aus etiolierten *R. communis*-Keimlingen zu entwickeln. Es ist im Vergleich zu *A. thaliana* wesentlich einfacher, große Mengen an Glyoxysomen aus diesem Material zu isolieren (2.22.2). Der experimentelle Nachteil der Arbeiten mit *R. communis* besteht darin, dass keine Mutanten zur Verfügung stehen.

Auch in diesen Versuchen wurden die Glyoxysomen im Rohextrakt mit den radioaktiv markierten Substraten inkubiert, um der natürlichen Situation der Zelle näher zu kommen. Zu den Ansätzen wurden alternativ noch ATP (100 mM) bzw. CoA (5 mM) hinzugefügt. Nach

30 min bzw. 3 h wurden die Proben auf einen linearen Percoll-Gradienten geladen und für 90 min bei 40000 x g zentrifugiert. Es war dann eine Bande im oberen Bereich des Gradienten bei etwa 25 % Percoll (Fraktion II) und eine Bande (enthält die intakten Glyoxysomen) im unteren Bereich bei etwa 30 % Percoll (Fraktion IV) sichtbar (Abb. 16). Die Glyoxysomenfraktion wurde mit einer Glaspipette entnommen und die Radioaktivität mittels Szintillationsanalyse ermittelt.

In Vorversuchen wurde nach der optimalen Ausgangskonzentration für die radioaktiv-markierten Substrate gesucht. Bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  freie  $[1-^{14}\text{C}]$ -18:1-Fettsäure bzw.  $[1-^{14}\text{C}]$ -16:0-Acyl-CoA war so gut wie keine Aufnahme zu beobachten. Bei einer Substratkonzentration von 0,32  $\mu\text{M}$  konnte ein signifikanter Transport für beide Substrate nachgewiesen werden, wobei es keine klare Präferenz für eines der beiden Substrate gab. Erst eine Ausgangskonzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  freie  $[1-^{14}\text{C}]$ -18:1-Fettsäure bzw.  $[1-^{14}\text{C}]$ -16:0-Acyl-CoA zeigte einen signifikanten Unterschied in der Aufnahme der Substrate.



**Abb. 16: Verteilung der Glyoxysomen im Percoll-Gradienten.** Der Rohextrakt von etiolierten *A. thaliana* bzw. *R. communis* Keimlingen wurde mit radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Die Isolation der Glyoxysomen und die Abtrennung des nicht aufgenommenen Substrates erfolgten durch Dichtegradienten-Zentrifugation (2.22.2). Die resultierende Verteilung der Glyoxysomen im Percoll-Gradienten und die untersuchten Fraktionen I-IV sind hier dargestellt.

In Tabelle 6 sind die unterschiedlichen Testbedingungen und Ergebnisse des Transportversuches bei einer Substratkonzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  zusammengefasst. Damit die Ergebnisse der vier Ansätze vergleichbar waren, wurden die ermittelten DPM-Werte durch den Bezug zur ebenfalls gemessenen Malat-Synthase-Aktivität der Glyoxysomenfraktion ins Verhältnis gesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min ist zwischen der Aufnahme von Ölsäure und Palmitoyl-CoA ein signifikanter Unterschied erkennbar, wobei Palmitoyl-CoA in einer ca. 10-fach höheren Menge in der Glyoxysomenfraktion vorlag. Durch die zusätzliche Anwesenheit von CoA wird die Aufnahme der freien Fettsäuren leicht erhöht. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass im Rohextrakt vorhandene Acyl-CoA-Synthetasen (ACS) die freie Fettsäure umsetzen und dabei das CoA verwenden. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, dass bevorzugt Acyl-CoA-Ester in Glyoxysomen transportiert werden. Im Falle von 16:0-CoA erhöht sich die Aufnahme durch die Gegenwart von ATP nicht. Da vermutet wird, dass ATP-abhängige ABC-Transporter für den Transport von Fettsäuren bzw. Acyl-CoA-

Estern verantwortlich sind, ist dieses Ergebnis unerwartet. Eine verlängerte Inkubationszeit von 3 h erhöhte die Aufnahme der Substrate für freie Fettsäuren um das 4,6 fache und für Acyl-CoAs um das 2,6 fache.

Da im Rohextrakt sowohl Acyl-CoA-Synthetasen als auch Thioesterasen noch aktiv sein können und das hier verwendete Substrat beeinflussen können, wurden diese beiden Aktivitäten im Rohextrakt überprüft (2.24.2; 2.24.3). Eine ACS-Aktivität für langkettige Fettsäuren (18:1) konnte dabei nachgewiesen werden (0,0275 pmol 18:1-CoA/min). Was bedeutet, das ein sehr geringer Teil (~ 2 %) der gemessenen Radioaktivität des ursprünglichen Substrates 18:1 demnach 18:1-CoA entspricht (in Gegenwart von CoA). Intaktheitsmessungen (2.24.1) der Glyoxysomen des Rohextraktes zeigten, dass zu Beginn der Substratzugabe ca. 56 % der Glyoxysomen intakt waren und nach 30 min durchschnittlich 35 % bzw. nach 3 h 29 %. Durch nicht mehr intakte Peroxisomen wurde die peroxisomale ACS-Aktivität mit der Zeit auch für Substrate außerhalb des Organells zugänglich.

**Tabelle 6: Substrataufnahme in Glyoxysomen aus *R. communis* unter verschiedenen Transportbedingungen.** Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der unter 3.6.1 erläuterten Transportstudie.

ATP	+		+	+
CoA			+	
Substrat	<b>18:1/pmol</b>	<b>16:0-CoA/pmol</b>	<b>18:1/pmol</b>	<b>16:0-CoA/pmol</b>
t =30 min	20	202	38	193
t=3 h	91			509

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Transportstudie nachgewiesen werden konnte, dass sowohl freie langkettige Fettsäuren als auch langkettige Acyl-CoA-Ester von den Glyoxysomen aufgenommen wurden und dass hierbei eine deutliche Präferenz für Acyl-CoA-Ester besteht.

### 3.6.2 Glyoxysomale $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren

Um ein genaueres Bild von dem Transport von langkettigen Fettsäuren durch Membranen aus isolierten Glyoxysomen von *R. communis*-Keimlingen zu erhalten, sollte die  $\beta$ -Oxidationsfähigkeit der Glyoxysomen überprüft werden. Wenn freie Fettsäuren bzw. Acyl-CoA-Ester nach einer definierten Inkubationszeit mit intakten Glyoxysomen abgebaut werden, so würde dies zeigen, dass die Substrate auch tatsächlich in die glyoxysomale Matrix transportiert wurden und sich nicht möglicherweise nur in der äußeren Membran einlagern

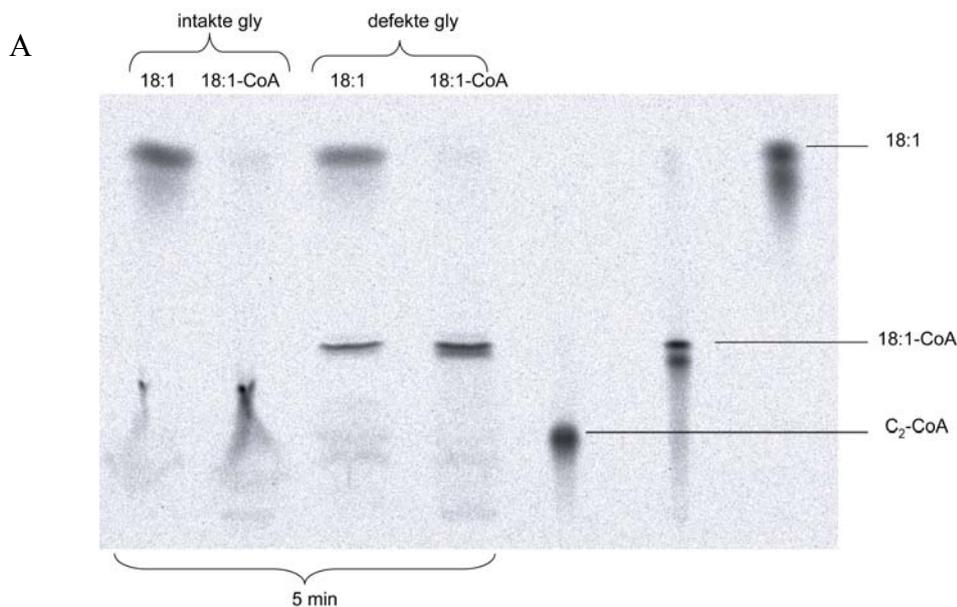
und damit kein echter Transport stattfindet. Darüber hinaus sollte geprüft werden, wie sich die Transportrate für beide Substrate unterscheidet. Um diesen Aufgabestellungen nachzugehen, wurden Glyoxysomen aus *R. communis* isoliert (2.22.2) und anschließend ein  $\beta$ -Oxidationstest (2.24.4) durchgeführt. In diesem Versuchsansatz wurde mit intakten und als Kontrolle mit osmotisch geschockten Glyoxysomen gearbeitet, wobei alle notwendigen Kofaktoren (ATP, CoA,  $Mg^{2+}$ , NAD) anwesend waren. Um die Glyoxysomen während der längeren Inkubationszeiten bei Raumtemperatur intakt zu halten, wurde dem Ansatz zusätzlich Saccharose zugefügt (350 mM). Die Reaktion wurde durch die Zugabe der radioaktiv markierten Substrate gestartet und durch Auftragen von Aliquots auf eine Dünnschichtplatte beendet. Durch die anschließende Chromatogramm-Entwicklung wurden langkettige Fettsäuren und Acyl-CoAs sehr gut voneinander getrennt. In den Abb. 17 sind repräsentative Dünnschichtplatten nach ihrer Entwicklung und Detektion unter zur Hilfenahme eines TLC-Scanners dargestellt. Der Transport und die Umsetzung der Substrate wurde durch die Bildung von  $[1-^{14}C]$ -Acetyl-CoA nachgewiesen. Die visuelle Beurteilung der detektierten Acetyl-CoA-Banden in diesem Versuch ergab, dass diese nicht exakt auf der Höhe der Referenzbande laufen. Es wird davon ausgegangen, dass die Zusammensetzung der Probe das Laufverhalten von Acetyl-CoA leicht verändert hat. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Bande bereits einem Produkt des Glyoxylatzyklus entspricht. Das diffuse Laufverhalten von 18:1-CoA in Fraktionen der intakten Glyoxysomen ist eindeutig auf den Zusatz von Saccharose zurückzuführen.

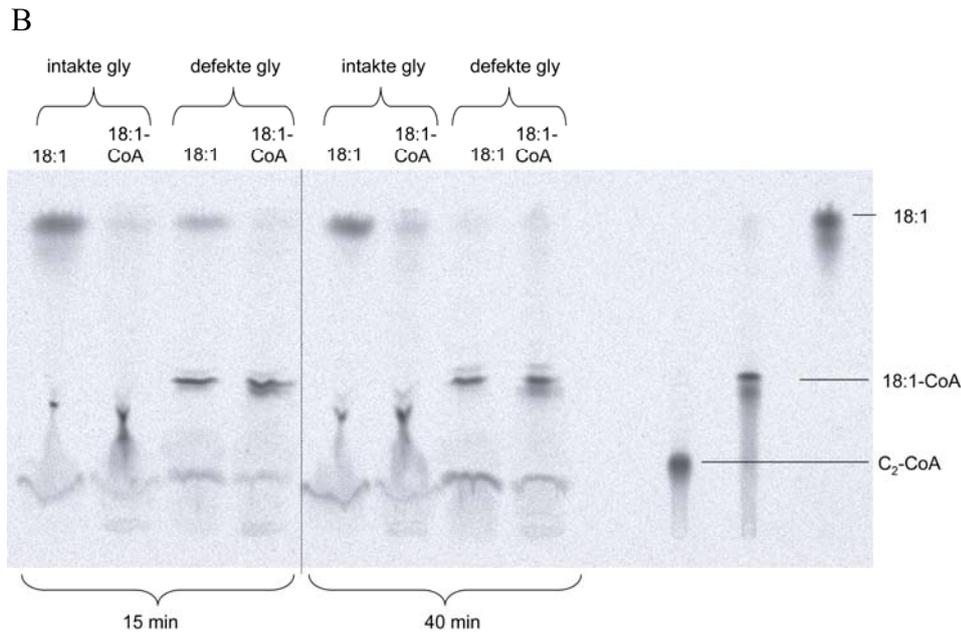
Nach einer Inkubationszeit von 5 min sind nur sehr schwache Acetyl-CoA-Banden im Chromatogramm erkennbar (Abb. 17 A). Dabei ist auch kein Unterschied zwischen intakten und osmotisch geschockten Glyoxysomen sowie den Substraten  $[1-^{14}C]$ -18:1 und  $[1-^{14}C]$ -18:1-CoA sichtbar. Im Falle des Transportes von 18:1 bedeutet die Anwesenheit einer 18:1-CoA-Bande im Ansatz mit intakten Organellen, dass ein Teil der Fettsäure bereits in die Glyoxysomen transportiert und durch ACS aktiviert wurde. Nach 15 bzw. 40-minütiger Inkubationszeit in Gegenwart von 18:1 weisen sowohl intakte als auch osmotisch geschockte Glyoxysomen sichtbar stärkere Acetyl-CoA-Banden im Vergleich zum Acyl-CoA Substrat auf (Abb. 17 B). Durch den erhöhten Transport der freien Fettsäure in die peroxisomale Matrix stand der  $\beta$ -Oxidationsmaschinerie mehr Ausgangssubstrat zur Verfügung, so dass mehr Acetyl-CoA gebildet werden konnte. Der Unterschied in der Signalintensität zwischen intakten Glyoxysomen und osmotisch geschockten Glyoxysomen ist bei beiden Substraten relativ klein, obwohl durch den osmotischen Schock die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation frei zugänglich sind und man dadurch eine schnellere Umsetzung der Substrate zu erwarten ist.

Eine Ausnahme bildet das 18:1-Signal nach 40-minütiger Substratinkubation (Abb. 17 B). Da kein 18:1-Signal mehr sichtbar ist, wurde das gesamte Ausgangssubstrat in der osmotisch geschockten Glyoxysomen-Fraktion verbraucht. Dabei wurde die Ölsäure zunächst als Acyl-CoA-Ester aktiviert und zum Teil über die  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, dass beide Substrate unter den Versuchsbedingungen in die Glyoxysomen transportiert und abgebaut wurden. Obwohl keine exakte Quantifizierung der radioaktiven Acetyl-CoA-Signale aufgrund des diffusen Laufverhaltens der Banden in Gegenwart von Saccharose erfolgen konnte, ergibt dieser Versuch eindeutige Hinweise auf einen schnelleren Transport von freien Fettsäuren.

Da von *R. communis* keine Mutanten erhältlich sind, ist eine Charakterisierung von Transportproteinen eingeschränkt. Durch funktionelle Rekonstitution des PXA1-Transporters aus *A. thaliana* in künstliche Lipidvesikel sollte im Folgenden der Fettsäuretransport weiter untersucht werden.





**Abb. 18: Auftrennung von markiertem 18:1, 18:1-CoA und Acetyl-CoA mittels Dünnschichtchromatographie.** Intakte und osmotisch geschockte (defekte) Glyoxysomen aus *R. communis* wurden mit [1-<sup>14</sup>C]-18:1 bzw. [1-<sup>14</sup>C]-18:1-CoA inkubiert (2.24.4). Zu den Zeitpunkten 5 min **A:** und 15 min bzw. 40 min **B:** wurden Aliquots auf eine Dünnschichtplatte aufgebracht und die Entwicklung erfolgte für mindestens 2 h im Laufmittelgemisch Butanol/Essigsäure/Wasser (5:2:3). Die radioaktiven Signale wurden mit Hilfe eines TLC-Scanners detektiert. Durch die mitgeführten Standards war eine Zuordnung der Signale möglich. Die Abbildung zeigt repräsentative Dünnschichtplatten aus zwei unabhängigen Experimenten. gly: Glyoxysomen

### 3.7 Untersuchung des peroxisomalen PXA1-Transporters im rekonstituierten System

Die funktionelle Rekonstitution des PXA1-Transporters in künstliche Vesikel (Liposomen) bietet zahlreiche Vorteile. Die Liposomen sind im Vergleich zu den intakten isolierten Peroxisomen wesentlich stabiler und dadurch besser geeignet für Transportstudien. Probleme durch Mikrokompartimentierungen sind ebenso ausgeschaltet, wie störende Protein-Aktivitäten. Die kinetischen Eigenschaften des PXA1-Transporters könnten so unabhängig von limitierenden und unbestimmbaren internen Substratkonzentrationen untersucht werden. Die Substratkonzentrationen im rekonstituierten System sind auf beiden Seiten der Membran frei wählbar, so dass unter definierten Bedingungen gearbeitet werden kann. Auf diese Weise konnte bisher die Aktivität einer Reihe von Transportern aufgeklärt werden. Das Ziel dieses Versuches war es Hinweise auf die Substratspezifität von PXA1 zu erhalten.

### 3.7.1 Expression von PXA1 in *S. cerevisiae*

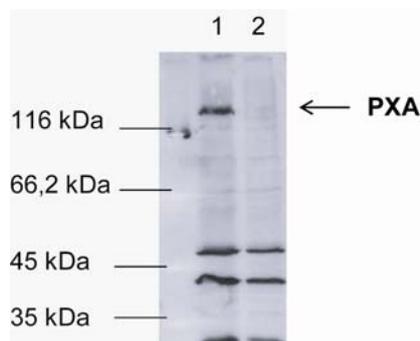
Für die Durchführung von Transportstudien an künstlichen Vesikeln war es zunächst notwendig ein Expressionssystem für PXA1 zu entwickeln, um ausreichende Mengen des Proteins isolieren zu können.

Für die heterologe Expression in *E. coli* Rossetta (DE3)pLysS-Zellen (2.12.1.1) wurde der kodierende Bereich des *PXA1*-Gens in den Expressionsvektor pET42c kloniert, um dieses N-terminal mit *Glutathione-S-transferase* (*GST*) zu fusionieren. Durch die Fusion mit *GST* wurde eine größere Löslichkeit des zu exprimierenden Membranproteins erwartet. Als Matrize für die Amplifikation der cDNA von *PXA1* mit den Primern ASfow und ctsPaeSbfI4014 diente der Vektor H1A6. Das *Sse8387I* und *NcoI* verdaute PCR-Produkt wurde anschließend in den pET42c-Vektor ligiert und für eine Transformationsreaktion eingesetzt (2.8.1). Die Induktion der Genexpression durch IPTG führte bei unterschiedlichen Wachstumstemperaturen (10 °C, 20 °C, 37 °C) und unterschiedlichen Induktionszeiten zu keiner nachweisbaren Synthese von PXA1. Es wurde in einem parallelen Ansatz versucht nur den 1. potentiellen Halbtransporter zu exprimieren. Für die Klonierung dieses N-terminalen Fragmentes von PXA1 wurden die Primer ASfow und AS2010 verwendet. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls als *NcoI/Sse8387I*-Fragment in den pET42c-Vektor ligiert. Western Blot-Analysen führten jedoch weder zur Detektion des vollständigen PXA1-Proteins noch des potentiellen Halbtransporters (2.11.6; Daten nicht gezeigt). Daher wurde zu dem eukaryontischen Expressionswirt *S. cerevisiae* gewechselt.

Mit dem pYES2NTC-Vektor wurde ein weiteres Expressionskonstrukt kloniert, wobei der N-Terminus von PXA1 an einen (His)<sub>6</sub>-Tag fusioniert wurde. Dazu wurde zunächst der pRS423prom.*AtPXA1*-Vektor (3.8.2) mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I verdaut. Das entstandene *PXA1*-Fragment wies kompatible Enden zu dem mit *Bam*HI und *Not*I geschnittenen pYES2NTC-Vektor auf. Das klonierte Plasmid pYES2NTCPXA1 wurde für eine Transformation von Hefezellen eingesetzt (2.8.2). Transformierte Hefezellen (YB332) wurden für mindestens zwei bis drei Tage in Minimalmedium (ohne Uracil) mit Raffinose angezogen. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von Galaktose induziert (2.12.1.2). Um die optimale Induktionszeit zu ermitteln, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4 h, 8 h, 24 h) Aliquots entnommen. Die Zellen wurden aufgeschlossen und die Membranen isoliert (2.12.2). Die Synthese von PXA1 wurde in den Membranfraktionen mit einem Western-Blot unter zur Hilfenahme eines Anti-His-Antikörpers überprüft (2.12.6). Es zeigte sich dabei, dass nach 8 h Induktionszeit die PXA1-Expression am stärksten war. Nach

24 h konnte nur noch eine sehr schwache PXA1-Bande detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Was daraufhin deutet, dass die Expression von PXA1 zeitabhängig war. Da PXA1 in den Membranfraktionen nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass das Protein auch korrekt in den Peroxisomen lokalisiert wurde. Aus den Membranen wurden die Proteine mit Hilfe eines Detergenzes (N-Octyl- $\beta$ -D-gluco-pyranoside) gelöst und sofort für die Rekonstitution in Liposomen eingesetzt (2.12.2). Da jedoch auch der endogene peroxisomale ABC-Transporter Pat1p/Pat2p (Homolog zu PXA1) in der Membranfraktion anwesend war, wurde die Expression zusätzlich in einem *PAT1*-defizienten Hefestamm (*pat1 $\Delta$* ) durchgeführt. Der Western-Blot in Abb. 18 (Spur1) zeigt die Expression von PXA1 nach 8 h Induktionszeit im Hintergrund der *pat1 $\Delta$* -Mutante (2.12.6). In der Spur 2 ist die Negativkontrolle aufgetragen, wobei nur leerer pYES2NTC-Vektor für die Expression eingesetzt wurde. Der Anti-His-Antikörper detektierte eine Bande bei ca. 130 kDa.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression von PXA1 im heterologen System erfolgreich war und damit die Basis für die Herstellung von Proteoliposomen und für die weitere biochemische Charakterisierung des Proteins geschaffen wurde.



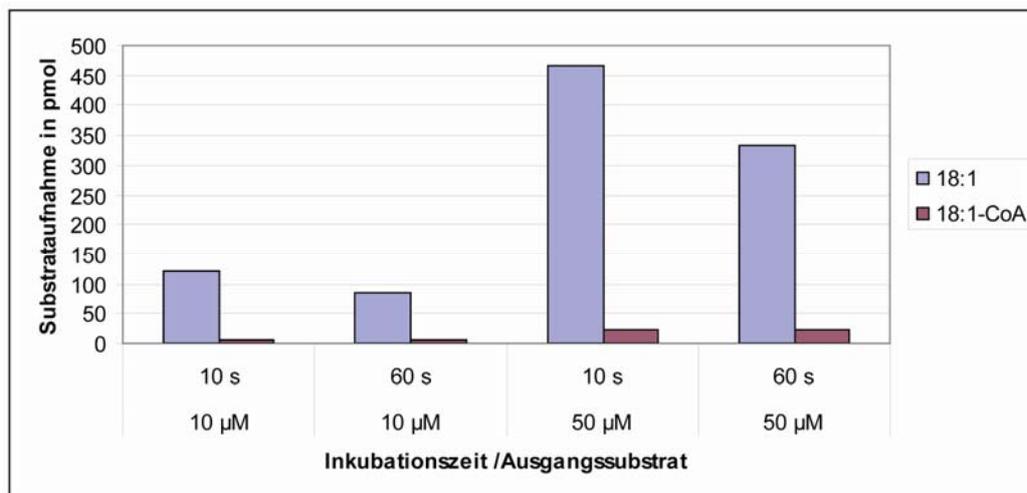
**Abb. 18: Heterologe Expression von PXA1 in *S. cerevisiae pat1 $\Delta$* -Zellen.** Solubilisierte Membranproteine wurden durch Elektrophorese im 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran durch Tetra-His-Antikörper detektiert (2.12.6). Spur 1: Expression von PXA1; Spur 2: Leervektorkontrolle

### 3.7.2 Fettsäuretransport in Proteoliposomen

Für die Rekonstitution des PXA1-Transporters in Liposomen wurde auf eine Methode von Hanning *et al.* (1999) zurückgegriffen (2.20). Zunächst wurde das PXA1-Protein in *S. cerevisiae* überexprimiert (2.12.1.2) und anschließend aus den isolierten Membranen zusammen mit anderen Membranproteinen unter Verwendung eines Detergenzes solubilisiert (2.12.2). Das Protein-Detergenz-Gemisch wurde nun zu unterschiedlich vorbeladenen Liposomen hinzugefügt. Nach Gefrier-Tau- und Beschallungsschritten lagern sich Membranproteine häufig so in die Liposomen, dass große wasserlösliche Domänen zur Außenseite der Liposomen orientiert sind (Jung *et al.*, 1997). Untersuchungen von Contreras *et al.* (1996) an Fibroblasten konnten zeigen, dass sich die Nukleotidbinde-Domänen von ALDP, dem menschlichen Homolog von PXA1, auf der zytoplasmatischen Seite der

Peroxisomen-Membran befinden. Es ist also von einem gerichteten bzw. korrekten Einbau von PXA1 in die Liposomen-Membran auszugehen. Da der PXA1-Transporter ATP-abhängig funktioniert, wurde zum Substrat auch ATP hinzugegeben.

Bevor mit den Fettsäuretransportbestimmungen in Proteoliposomen begonnen wurde, wurde der unspezifische Transport von Fettsäuren und Acyl-CoA-Estern in Liposomen (ohne Protein) getestet. Dabei zeigte sich, dass bereits nach ca. 10 s der Transport bzw. die Bindung an die Liposomen sowohl für die freien Fettsäuren (10  $\mu$ M / 50  $\mu$ M [1- $^{14}$ C]-18:1) als auch für die Acyl-CoA-Ester (10  $\mu$ M/50  $\mu$ M [1- $^{14}$ C]-18:1-CoA) gesättigt war. Acyl-CoA-Ester wurden unter den Versuchsbedingungen geringfügig transportiert. Im Vergleich war der Anteil der unspezifischen Aufnahme für freie Fettsäuren durchschnittlich 20-fach höher (Abb. 19). Diese Ergebnisse zeigen, dass Acyl-CoA-Ester *per se* nicht membrandurchlässig sind und demnach Transportproteine für den Durchtritt durch die peroxisomale Membran benötigen.



**Abb. 19 [1- $^{14}$ C]-18:1- bzw. [1- $^{14}$ C]-18:1-CoA-Transport in Liposomen.** Die erzeugten Liposomen waren mit folgendem Puffer vorbeladen: 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM Tricin pH 8, 5 mM DTT, 0,6 mM CoA. Der Transport wurde durch Zugabe der markierten Substrate gestartet. Nach 10 s bzw. 60 s wurden Aliquots auf eine DOWEX 1 x 8 Anionenaustauschersäule gegeben. Der Transport wurde somit gestoppt. Das nicht aufgenommene Substrat blieb am Säulenmaterial haften und die Liposomen wurden von der Säule eluiert. Die radioaktiven Eluate wurden im Szintillationszähler bestimmt. Insgesamt wurden 5 unabhängige Messungen durchgeführt.

Um die Menge an unspezifischen Transport zu minimieren, wurden nun die Substrate vor dem Transportversuch mit entfetteter BSA komplexiert. Das Verhältnis von Fettsäure zu BSA lag bei 3,56:1. Damit konnte die unspezifische Aufnahme soweit verringert werden, dass mit Transportmessungen von Proteoliposomen begonnen wurde. Es wurden die isolierten Membranproteine aus *pat1* $\Delta$ -Zellen nach PXA1-Expression und als Kontrolle ohne PXA1-Expression (Leervektorkontrolle) in Liposomen inkorporiert. Zusätzlich wurden auch

Liposomen ohne Proteine mitgeführt. Die Vesikel waren mit 30 mM ATP, 3,5 mM CoA, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,36 nkat ACS vorbeladen. Des Weiteren wurden Kontrollansätze ohne ACS Vorbeladung mitgeführt. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Substrate wurden nach 30 s Aliquots direkt auf Anionenaustauschersäulen aufgetragen. Der Reaktionsstopp erfolgte durch das Eindringen der Liposomen in die Säule und die Bindung des Substrates an das Säulenmaterial. Die Radioaktivität des Eluats wurde mit dem Szintillationszähler ermittelt. Die gemessenen DPM-Werte lassen keine Rückschlüsse auf einen erhöhten Transport von 18:1 bzw. 18:1-CoA in Anwesenheit von PXA1 zu. Die Mengen an aufgenommener Fettsäure bzw. CoA-Ester sind relativ gering und unterscheiden sich nicht signifikant. Ein deutlicher Unterschied in der Aufnahme der Substrate ist nur in Liposomen ohne Proteineinlagerung zu verzeichnen. Dabei erhöht sich die Aufnahme von 18:1 gegenüber 18:1-CoA in ACS vorbeladenen Liposomen um ca. das 19-fache (Tabelle 7). Interessanterweise unterscheidet sich der Transport von freien Fettsäuren in ACS vorbeladene Liposomen bzw. Proteoliposomen. Demnach behindern Membranproteine die Aufnahme bzw. vektorielle Acylierung der Fettsäuren.

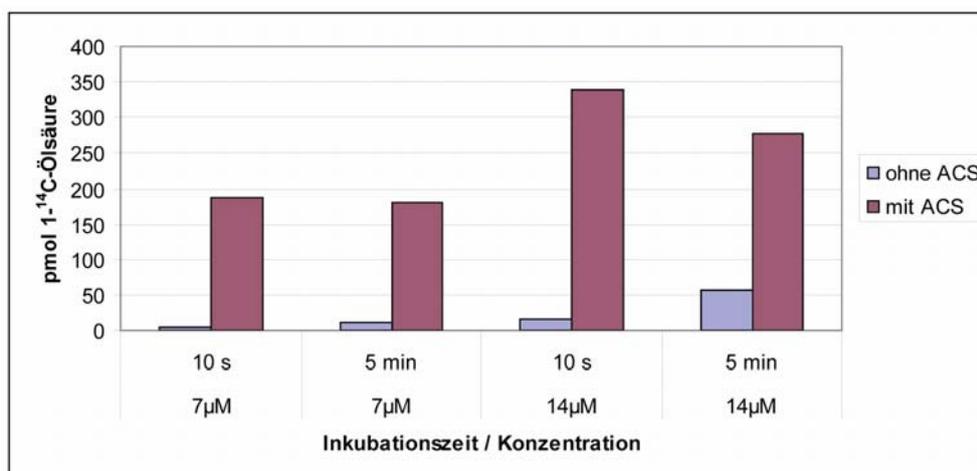
**Tabelle 7: Substrattransport in Proteoliposomen.** Es wurde die transportierte Menge prozentual zur eingesetzten Ausgangssubstratmenge aufgeführt, da unterschiedliche Ausgangssubstratmengen vorlagen: [1-<sup>14</sup>C]-18:1 (0,7 µM); [1-<sup>14</sup>C]-18:1-CoA (15 µM). Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Liposomen		mit ACS- Vorbeladung	ohne ACS- Vorbeladung
<b>ohne Protein</b>	<sup>14</sup> C-18:1	11,5 %	2,1 %
	<sup>14</sup> C-18:1-CoA	0,6 %	1,3 %
<b>PXA1</b>	<sup>14</sup> C-18:1	3 %	4,8 %
	<sup>14</sup> C-18:1-CoA	1,7 %	4 %
<b>ohne PXA1- Expression</b>	<sup>14</sup> C-18:1	3,3 %	(15,9 %)
	<sup>14</sup> C-18:1-CoA	1,4 %	2,1 %

Der Einfluß der ACS auf den Transport von 18:1 wurde noch genauer untersucht. Dazu wurden Liposomen (ohne Protein) mit bzw. ohne ACS-Vorbeladung mit radioaktiver [1-<sup>14</sup>C]-Ölsäure bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Aliquot dieser Liposomen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten auf eine Dowex-Säule aufgetragen, um den Substrattransport zu stoppen und die Liposomen von dem nicht aufgenommenen Substrat abzutrennen. Die Radioaktivität des Eluates wurde im Szintillationszähler ermittelt (2.23). In der Abb. 20 wird

deutlich, dass in Gegenwart der ACS der Transport der freien Fettsäuren in die Liposomen schneller abläuft, als in Vesikeln ohne ACS-Beladung. Innerhalb von 10 s wurden 188 pmol der markierten Ölsäure in die Vesikel mit ACS-Vorbeladung eingebaut. Dabei wurde nach 5-minütiger Inkubation keine weitere Substrataufnahme beobachtet. Die Aufnahmemenge verdoppelt sich, proportional zur Substratkonzentration (14  $\mu\text{M}$  18:1) im Inkubationsmedium. Da der Transportvorgang mit einer Aktivierung der Fettsäuren zu Acyl-CoA verbunden ist, bezeichnet man diesen gerichteten Transport auch als vektorielle Acylierung. Im Vergleich dazu, wird in Abwesenheit der ACS in den Liposomen bei einer Substratkonzentration von 7  $\mu\text{M}$  18:1 im Inkubationsmedium eine ca. 52-fach geringere Menge (3,6 pmol) an Substrat zum Zeitpunkt 10 s aufgenommen. Nach 5 min beträgt die Differenz zu den Liposomen ohne ACS-Vorbeladung nur noch den Faktor 17. Bei doppelter Substratkonzentration (14  $\mu\text{M}$  18:1) ist die Stoffaufnahme nach 10 s um das 21-fache bzw. nach 5 min um das 5-fache verringert. Es zeigt sich hierbei, dass der Unterschied in der Aufnahmemenge zwischen ACS-beladenen und unbeladenen Vesikeln auch durch die angebotene Substratmenge beeinflusst wird.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass für den Transport von freien Fettsäuren *per se* ein Transporterprotein nicht benötigt wird. Die Fettsäuren passieren demnach die Membran durch passive Diffusion. Damit wurde ein indirekter Hinweis erhalten, dass eine Interaktion zwischen PXA1 und peroxisomalen LACS für den Transport von freien Fettsäuren nicht notwendig ist.



**Abb. 20: Einfluss der ACS auf den Transport von freier 18:1 in Liposomen.** Liposomen (1 ml) wurden alternativ mit einer ACS aus *Pseudomonas sp.* (0,36 nkat) vorbeladen. Der Transport wurde durch die Zugabe von 7  $\mu\text{M}$  bzw. 14  $\mu\text{M}$  [1- $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure im Komplex mit BSA gestartet. Die Substrataufnahme wurde nach 10 s bzw. 5 min beendet, indem ein Aliquot des Reaktionsansatzes auf eine DOWEX 1 x 8 Anionenaustauschersäule aufgetragen wurde. Die Radioaktivität der Eluate wurde im Szintillationszähler bestimmt. Insgesamt wurden vier unabhängige Messungen durchgeführt.

Eine Optimierung der Bedingungen für den Transporttest ist notwendig, um kinetische Konstanten des PXA1-Transporters für den Fettsäuretransport zu erhalten. Eine dieser Möglichkeiten besteht beispielsweise darin, den PXA1-Transporter zu reinigen, in Liposomen zu rekonstituieren und mit diesen Proteoliposomen Transportmessungen durchzuführen. Darüber hinaus könnte eine Energetisierung der Membran durch einen Protonengradienten eine Verbesserung des Transportes bewirken.

### 3.8 Komplementationsstudien mit dem pflanzlichen Transporter PXA1 in *S. cerevisiae*

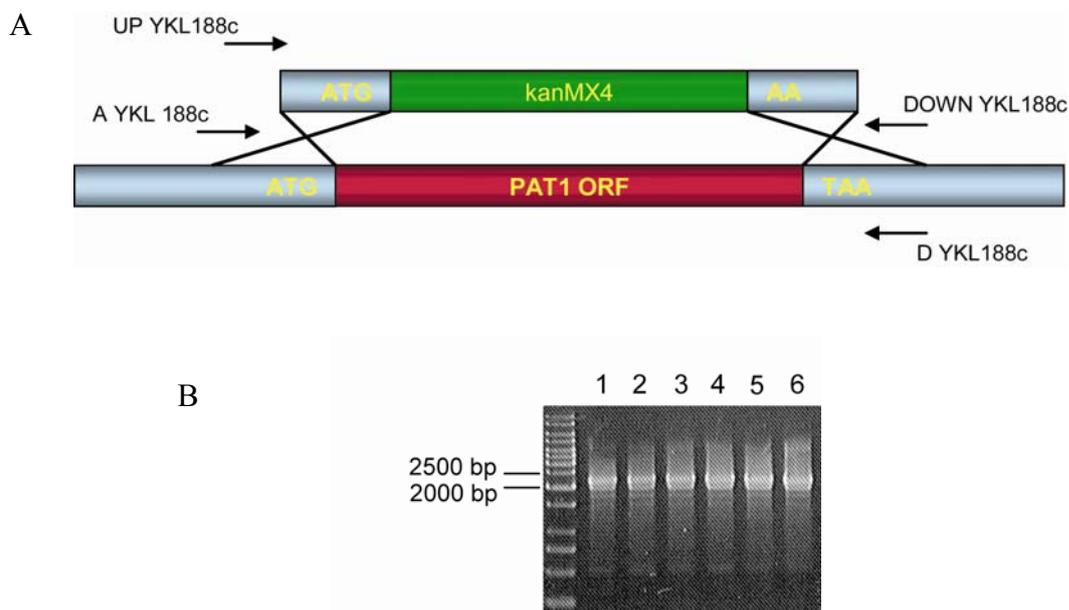
Der Fettsäuretransport in die Peroxisomen von *S. cerevisiae* ist im Detail besser verstanden als in *A. thaliana*. Durch Komplementation von Hefemutanten mit dem pflanzlichen ABC-Transporter PXA1 sollten Rückschlüsse bezüglich der Funktionsweise des Transporters gewonnen werden.

Es wird postuliert, dass das Heterodimer der peroxisomalen ABC-Transporter-Proteine Pat1 und Pat2 aus *S. cerevisiae* langkettige Acyl-CoA-Ester transportiert (Hetteema *et al.* 1996). Eine Deletion eines der beiden Gene, die für diese Proteine kodieren, führt zu einem beeinträchtigten Wachstum auf Agarplatten mit Ölsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle. Eine zusätzliche Deletion, die für die Aktivierung von hauptsächlich mittelkettigen Fettsäuren verantwortlichen peroxisomalen ACS Faa2p, unterbindet das Wachstum auf diesem Medium vollständig (Hetteema *et al.* 1996). Das Wachstumsverhalten der *PXA1*-exprimierenden Mutantenstämme *pat1Δ* und *patΔ faa2Δ* auf Oleatplatten, sollte Aufschluss darüber geben, ob die freie oder die aktivierte Fettsäure das Substrat des Transporters bildet. Hierfür sollten zunächst die Deletionsmutanten *pat1Δ* und *pat1Δ faa2Δ* erzeugt werden.

#### 3.8.1 Herstellung der Mutantenstämme *pat1Δ* und *pat1Δ faa2Δ*

In einem ersten Schritt wurde eine Deletionskassette für den *PAT1*-ORF konstruiert. Dazu wurde die genomische DNA des kommerziell erhältlichen (Euroscarf) Mutantenstammes BY4741 (*ykl188c(pat1Δ)::kanMX4*) isoliert und als Matrize für eine PCR-Reaktion eingesetzt (2.9.3). Die mit den Primern YKL188C\_up und YKL188C\_do amplifizierte *PAT1*-Deletionskassette wies neben dem Modul des Resistenzmarkers *kanMX4* (*kanR*-Strukturgen mit regulatorischen Bereichen) an den Enden homologe Bereiche zu den 5'- bzw. 3'-flankierenden Sequenzen des deletierten Gens auf. Nach der Transformation von YB332 (WT) und YB485 (*faa2Δ::LEU2*) mit diesen PCR-Fragmenten ließen sich die Zellen mit

stabilen Genomrekombinationen auf YEPD-Medium mit Geneticin (G418) selektieren (2.8.3). Die erzeugten Deletionsmutanten *pat1* $\Delta$  bzw. *pat1* $\Delta$  *faa2* $\Delta$  wurden mittels PCR auf die korrekte Substitution am vorgesehenen Locus überprüft. Die verwendeten Primer (A/D) hybridisierten in den Bereichen vor dem Startkodon und nach dem Stopkodon des *PAT1* Gens (Abb. 21 A). Eine Analyse der PCR-Produkte ist in Abb. 21 B zu sehen. Die 2234 bp Bande zeigt die erfolgreiche Deletion des *PAT1*-ORFs in allen sechs unabhängig erhaltenen Transformationslinien. Der unmodifizierte *PAT1*-ORF hätte im Vergleich eine 3212 bp große Bande aufzuweisen.



**Abb. 21: Überprüfung der genomischen DNA der Deletionsmutanten *pat1* $\Delta$  (YB332) und *pat1* $\Delta$  *faa2* $\Delta$  (YB332) mittels analytischer PCR. A:** Schematische Darstellung der chromosomalen Integration der Deletionskassette über homologe Rekombination. **B:** Bei korrekter Insertion des *kanMX*-Moduls in den *PAT1*-Genlocus wurde unter Verwendung der Oligonukleotidkombination A\_YKL188c/D\_YKL188c ein PCR-Amplifikat mit einer Länge von 2234 bp erwartet. Das Agarosegel zeigt in den Spuren 1-5 fünf unabhängig erzeugte *pat1* $\Delta$  Transformanten und in Spur 6 eine generierte *pat1* $\Delta$  *faa2* $\Delta$  Transformante.

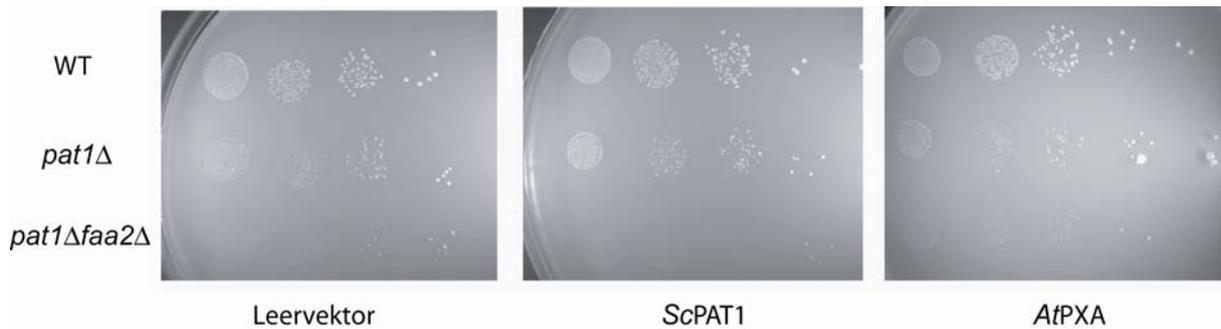
Die erzeugten Mutanten wurden darüber hinaus auf ihr Wachstumsverhalten auf Minimalmedium mit Ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle überprüft (2.4). Dazu wurden die Mutanten über Nacht in Minimalmedium mit 0,3 % Glukose kultiviert und mit gleicher Zellkonzentration in unterschiedlichen Verdünnungen auf eine Oleatplatte überführt (Tropftest). Das Wachstum der *pat1* $\Delta$ -Mutante auf diesem Medium wurde in der Literatur von Hetteema *et al.* (1996) als beeinträchtigt beschrieben. Dieser Phänotyp konnte reproduziert werden (Abb. 24 A). Der Doppeldeletionsstamm *pat1* $\Delta$  *faa2* $\Delta$  war wie erwartet nicht mehr in

der Lage zu wachsen. Damit standen die Stämme für eine Komplementationsanalyse mit dem pflanzlichen ABC-Transporter PXA1 zur Verfügung.

### 3.8.2 Wachstumsverhalten der transformierten Mutantenstämme *pat1*Δ und *pat1*Δ *faa2*Δ auf Fettsäure-haltigem Medium

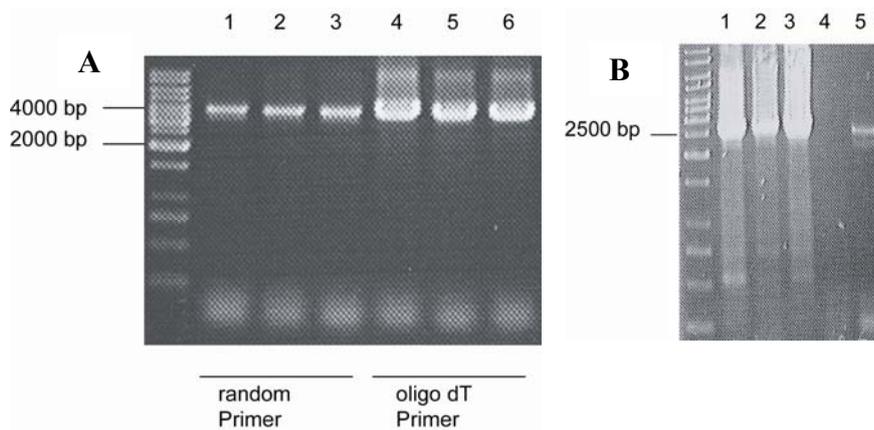
Für die Expression des pflanzlichen PXA1-Transporters bzw. des PAT1-Transporters aus *S. cerevisiae* (Positivkontrolle) in den erzeugten Mutantenstämmen wurden Expressionsplasmide konstruiert. Der Vektor H1A6 wurde dabei als Matrize für die Amplifizierung der 4014 bp-langen cDNA von *PXA1* verwendet. Das unter zur Hilfenahme der Primer ASctsfBamHI und ASctsrClaI generierte PCR-Produkt wurde zunächst in den pGEM-T-Vektor kloniert. Der pGEM-T-Vektor wurde im Anschluss mit den Enzymen *Bam*HI und *Cla*I verdaut und das resultierende *PXA1* Fragment gerichtet in den zuvor geschnittenen Vektor pRS423prom. ligiert. Als Matrize für die Amplifizierung von *PAT1* wurde isolierte genomische DNA des Stammes YB332 verwendet. Die Primer Pat1fBamHI und Pat1rClaI wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt. Das Amplifikat wurde direkt als *Cla*I/*Bam*HI-Fragment in den Vektor pRS423prom. kloniert.

Die mit den Plasmiden pRS423prom., pRS423prom.*Sc*PAT1 und pRS423prom.*At*PXA1 transformierten Hefestämme YB332 (WT), *pat1*Δ und *pat1*Δ *faa2*Δ wurden auf Minimalmedium ohne Histidin selektiert (2.4). Die positiven Transformanten wurden für einen Tropftest eingesetzt, um das Wachstumsverhalten auf Ölsäure-haltigem Medium zu überprüfen (Abb. 22). Der Wachstumsvergleich der Stämme, die mit dem Leervektor transformiert worden sind, zeigt wie bereits beschrieben (3.8.1) für den Doppeldeletionsstamm *pat1*Δ *faa2*Δ den stärksten Wachstumsdefekt. Die Kolonien der Einzelmutante *pat1*Δ sind im Vergleich zum Wildtyp verkleinert und weisen damit ein beeinträchtigtes Wachstum auf. Das Wachstumsverhalten der mit den Plasmiden pRS423prom.*Sc*PAT1 und pRS423prom.*At*PXA1 transformierten Stämme unterscheidet sich jedoch nicht von der Leervektorkontrolle. Die *faa2*Δ-Einzelmutante weist keinen Wachstumsphänotyp auf Oleatmedium auf (Abb. 26), daher wurde erwartet, dass sich die Mutantenstämme *pat1*Δ und *pat1*Δ*faa2*Δ nach der Transformation mit dem pRS423prom.*Sc*PAT1 Plasmid wie der Wildtypstamm YB332 verhalten. Da dies jedoch nicht der Fall war, wurden eine Reihe von Untersuchungen angeschlossen, die diesen Phänotyp überprüfen sollten.



**Abb. 22: Wachstumsverhalten von YB332 (WT); *pat1*Δ und *pat1*Δ *faa2*Δ nach Transformation der Stämme mit den Plasmiden: pRS423prom., pRS423prom.ScPAT1 und pRS423prom.AtPXA1 in Gegenwart von Ölsäure.** Aus einer Vorkultur (in 0,3 % igen Glukose-Minimalmedium) wurde eine Zelldichte von  $OD_{600}=0,1$  mit sterilem A. dest. eingestellt. Nach einer sukzessiven 10-fach Verdünnung der Zellen wurden 5  $\mu$ l der Ansätze auf die Agarplatten getropft und für ca. 1 Woche bei 30 °C inkubiert.

In einem ersten Experiment wurde getestet, ob *PATI* bzw. *PXAI* in Minimalmedium mit 0,3 % Glukose auch tatsächlich exprimiert werden. Dazu wurde aus Übernachtskulturen die Gesamt-RNA isoliert (2.9.6). Nach einer DNase-Behandlung wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (2.10). Es wurden zwei Ansätze zur Herstellung der cDNA durchgeführt. Zum einen wurden oligo-dT Primer eingesetzt, um die Konvertierung von mRNA zu cDNA am 3'-Ende der Gene zu starten. Zum anderen wurde wie im Fall von *PXAI* parallel random Primer eingesetzt. Diese zielen nicht auf den polyA-Schwanz der mRNA (wie die oligo-dT Primer), sondern bedingen den Start der cDNA-Synthese an einer zufälligen Position. Die synthetisierte cDNA wurde für eine PCR Reaktion mit genspezifischen Primern eingesetzt, die auch für die Klonierung *PATI* und *PXAI* in den Vektor pRS423prom. verwendet wurden. Die Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel (Abb. 23) zeigt, dass *PXAI*- bzw. *PATI*-Transkript in allen transformierten Stämmen nachweisbar ist. Das Ergebnis zeigt, dass die Gene *PATI* und *PXAI* zumindest in Minimalmedium unter Glukosemangelbedingungen jedoch in Abwesenheit von Ölsäure vollständig exprimiert werden.



**Abb. 23: Überprüfung der plasmidkodierte Expression von *PXAI* und *PAT1* in YB332, *pat1* $\Delta$  und *pat1* $\Delta$ *faa2* $\Delta$  in Minimalmedium mit 0,3 % Glukose.** Aus Übernachtskulturen in Minimalmedium mit 0,3 % Glukose wurde die Gesamt-RNA-isoliert. Diese wurde in cDNA konvertiert unter zur Hilfenahme von ‚random‘- bzw. ‚oligo dT‘-Primern und anschließend als Matrize für eine PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern eingesetzt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im Agarosegel. **A:** 1 und 4 YB332(WT)*PXAI*; 2 und 5 *pat1* $\Delta$ *PXAI*; 3 und 6 *pat1* $\Delta$ *faa2* $\Delta$ *PXAI*. Agarosegel **B:** 1 YB332(WT)*PAT1*; 2 YB332(WT)Leervektor; 3 *pat1* $\Delta$ *faa2* $\Delta$ *PAT1*; 4 *pat1* $\Delta$ Leervektor; 5 *pat1* $\Delta$ *PAT1*

Eine weitere Überlegung, weshalb das endogene Pat1-Protein den Mutantenphänotyp auf Oleatplatten nicht komplementieren konnte war, dass möglicherweise der verwendete konstitutive *MET25*-Promotor auf Ölsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle nicht aktiv war. Der *MET25*-Promotor kontrolliert unter natürlichen Bedingungen die Expression der O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase aus dem Methioninstoffwechsels (Brzywczy und Paszewski, 1993).

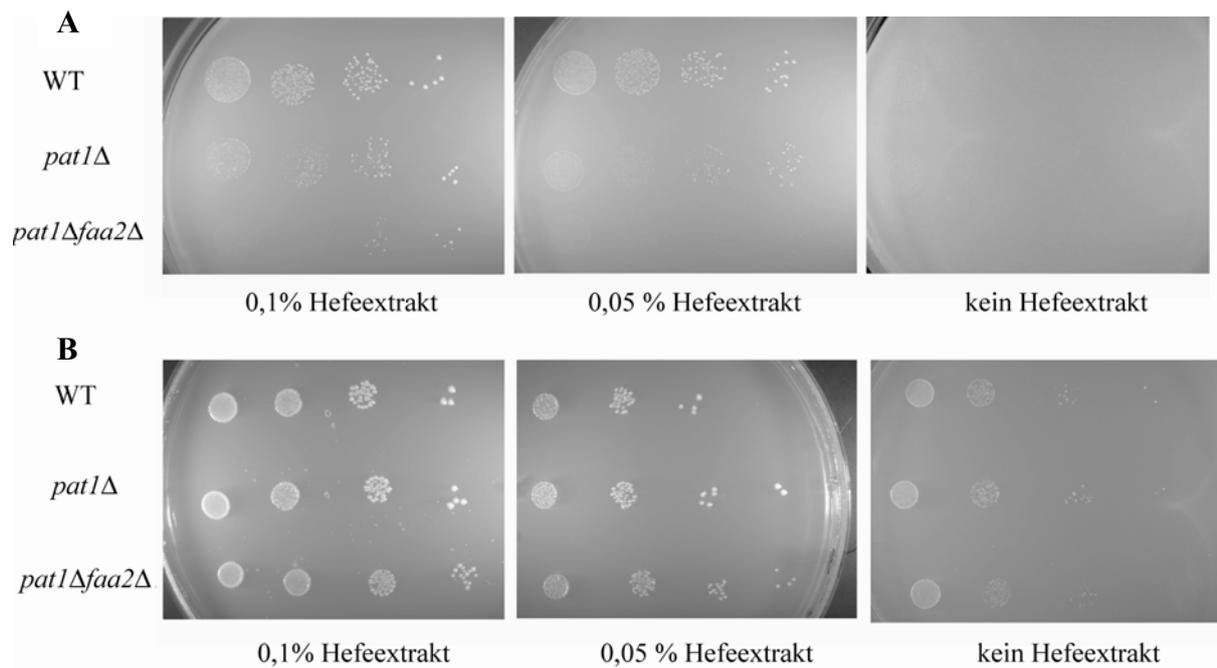
Die erfolgreiche Komplementation von *PAT1* unter der Kontrolle des endogenen Promotors erschien als ebenso wenig aussichtsreich, da in einem der nachfolgenden Kapitel vorgestellten Komplementationsversuch (3.10.1) der *pat1* $\Delta$  *fat2* $\Delta$ - bzw. *faa2* $\Delta$  *fat2* $\Delta$ -Doppeldeletionsmutanten mit dem von Euroscarf erworbenen pYCG-*FAT2* Plasmid auf Oleatmedium keine Komplementation stattfand. *FAT2* stand dabei unter der Kontrolle des endogenen Promotors. Für die Komplementation der *pat1* $\Delta$  bzw. *pat1* $\Delta$  *faa2* $\Delta$ -Deletionsmutante ist ein solches Plasmid von Euroscarf nicht erhältlich.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass als Kriterium für die Aufnahme und den Abbau von Fettsäuren in Peroxisomen das Wachstumsverhalten der Stämme auf fettsäurehaltigem Medium als alleiniger Kohlenstoffquelle gilt. Eine beeinträchtigte Peroxisomenfunktion könnte somit die  $\beta$ -Oxidation und damit die Verwertung von Fettsäuren verhindern (Erdmann *et al.*, 1989).

Um zu untersuchen, ob das Wachstum von *S. cerevisiae* auf Ölsäureplatten tatsächlich auf einer Verwertung der Ölsäure beruht, wurden Wachstumsversuche mit unterschiedlichen

Konzentrationen an Hefeextrakt durchgeführt. Die bisher verwendeten Medien für einen Tropftest enthielten 0,1 % Hefeextrakt (2.4). Die Zellen könnten somit den beigefügten Hefeextrakt ebenfalls als Kohlenstoffquelle verwerten. Der Tropftest (Abb. 24 A) zeigt das unterschiedliche Wachstumsverhalten des Stammes YB332 und der zwei Mutantenstämme *pat1Δ* und *pat1Δ faa2Δ* auf Ölsäure-haltigen Agarplatten mit 0,1 %, 0,05 % bzw. ohne Hefeextrakt. Bei einer Konzentration von 0,05 % Hefeextrakt wird das Wachstum der Mutantenstämme als auch des Ausgangsstammes sichtbar schwächer. Ohne Hefeextrakt sind die Zellen nicht mehr in der Lage zu wachsen. In der ersten Verdünnungsstufe des Ausgangsstammes und der *pat1Δ*-Mutante ist noch ein sehr schwaches Wachstum sichtbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Zellen von YB332 als auch der Mutanten *pat1Δ* und *pat1Δ faa2Δ* auf eine Verwertung des Hefeextraktes angewiesen sind und dass die Ölsäure nicht wie bisher angenommen als Kohlenstoffquelle genutzt wird. Die beobachteten Wachstumsphänotypen der Mutanten könnten zum einen auf der unterschiedlichen Verwertung des Hefeextraktes beruhen und zum anderen, ist auch ein inhibitorischer Effekt der Ölsäure auf das Wachstum der Mutanten nicht auszuschließen.

In einem weiteren Tropftest wurde das Wachstumsverhalten der Stämme auf Minimalmedium mit der mittelkettigen Fettsäure Laurat (12:0) getestet. Diese Fettsäure wurde in einer vergleichsweise niedrigeren Konzentration dem Medium beigefügt (25 μM Laurat; 0,1 % Ölsäure). Die Doppeldeletionsmutante *pat1Δ faa2Δ* weist im Vergleich zum Wachstum auf Oleatmedium (Abb. 24 B) einen wesentlich schwächeren Wachstumsdefekt auf Lauratmedium auf. Ohne Hefeextrakt ist das Wachstum aller Stämme stark beeinträchtigt. Es ist jedoch Wachstum auch ohne Hefeextrakt möglich. Dieses muss entweder auf der besseren Verwertung von Laurat als Kohlenstoffquelle beruhen oder auf einem geringeren inhibitorischen Effekt dieser Fettsäure.



**Abb. 24 Wachstumsverhalten von YB332 (WT); *pat1Δ* und *pat1Δ faa2Δ* in Gegenwart von langkettigen (A) bzw. mittelkettigen (B) Fettsäuren.** Die Minimalmedien unterscheiden sich in der Konzentration des Hefeextraktes. Aus einer Vorkultur (in 0,3 %igen Glukose-Minimalmedium) wurde eine Zelldichte von  $OD_{600}=0,1$  mit sterilem A. dest. eingestellt. Nach einer sukzessiven 10-fach Verdünnung der Zellen wurden 5  $\mu$ l der Ansätze auf die Agarplatten getropft und für ca. 1 Woche bei 30 °C kultiviert.

Die aus diesen Wachstumsversuchen gezogene neue Erkenntnis ist, dass von den Wachstumsphänotypen, nicht mehr wie ursprünglich angenommen, direkt Rückschlüsse auf die Verwertung der Ölsäure durch  $\beta$ -Oxidation bzw. auf das Substrat des pflanzlichen PXA1-Transporters gezogen werden können, da das Wachstum der Zellen auf einer Verwertung des Hefeextraktes beruht. Die beobachteten Wachstumsphänotypen hängen darüber hinaus entscheidend von der Länge der zugeführten Fettsäure ab.

### 3.9 Metabolisierung exogen zugeführter Fettsäuren in *S. cerevisiae*

Um die Aufnahme und die anschließende Verteilung von exogenen Fettsäuren in der Zelle zu beobachten, wurden verschiedene Mutanten mit der in der Hefe nicht vorkommenden Fettsäure Linolsäure inkubiert. Anschließend wurde die Menge an freien und veresterten Fettsäuren bestimmt, sowie die im Acyl-CoA-Pool vorkommenden Fettsäuren (2.14, 2.20, 2.21). Mit diesem Versuch sollten Rückschlüsse auf die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in der Transportermutante *pat1Δ* bzw. der ACS-Mutante *faa2Δ* gewonnen werden.  $\beta$ -Oxidations-Untersuchungen in *A. thaliana* haben bereits gezeigt, dass eine blockierte  $\beta$ -Oxidation zu

einer Akkumulation von langkettigen Acyl-CoA-Estern und freien Fettsäuren im Zytosol führt (3.1.4).

Für diese Untersuchung wurde neben YB332 die Mutanten *pat1Δ*, *pat1Δ faa2Δ*, *faa2Δ*, *fat1Δ* und *fat1Δ faa2Δ* (Scharnewski, Universität Göttingen) herangezogen. Die zytoplasmatische ACS Fat1p spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung exogener Fettsäuren (Watkins *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 2002, Zou *et al.*, 2003).

Die Abb. 25 A beschreibt das prozentuale Verhältnis der freien, gebundenen und zu Acyl-CoA aktivierten Fettsäuren in den unterschiedlichen Mutanten und der Kontrolle (WT) mit und ohne Linolsäurezugabe. Betrachtet man speziell den Anteil von Linolsäure (Tabelle 8) im Ausgangsstamm, so ist erkennbar, dass nur 7 % dieser Fettsäure in den freien Fettsäuren nachweisbar ist, der Anteil der gebundenen Fettsäuren jedoch 51 % ausmacht. Die 18:2-Acyl-CoA-Menge (10 %) ist ebenfalls verhältnismäßig gering. Diese Daten zeigen, dass aufgrund der reichlich zur Verfügung stehenden 18:2 im Medium und der im zeitlichen Verlauf abnehmenden Glukosekonzentration (anfänglich 0,3 %), große Mengen der Fettsäure in die Zelle transportiert wurden und in Lipide eingebaut worden sind. Dieses Verteilungsmuster ändert sich drastisch in den untersuchten Deletionsstämmen. Damit die exogenen Fettsäuren für die Energieproduktion der Zelle genutzt werden können, müssen diese zunächst in die Peroxisomen transportiert werden, um dort über den Prozess der  $\beta$ -Oxidation abgebaut zu werden. Die am Import von Fettsäuren in die Peroxisomen beteiligten Proteine sind wie schon erwähnt der ABC-Transporter Pat1p/Pat2p und die ACS Faa2p. Der Anteil von freier Linolsäure in den Deletionsstämmen *pat1Δ* (22 %) und *faa2Δ* (26 %) erhöht sich im Vergleich zur Kontrolle um mehr als das Dreifache. In der Doppeldeletionsmutante *pat1Δ faa2Δ* (38 %) addiert sich der Effekt der Einzelmutanten, was dafür sprechen könnte, dass im Gegensatz zu Pflanzen, Pat1 (als Heterodimer mit Pat2) und Faa2 in Hefe Proteine zweier unterschiedlicher Transportwege für Fettsäuren in Peroxisomen darstellen. Der prozentuale Anteil des Linoleoyl-CoA (18:2-CoA) in diesen Mutantenstämmen erbrachte eine durchschnittlich vierfache Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp, wobei der Anteil des Doppeldeletionsstammes nur geringfügig anstieg (Abb. 25 A).

Es wird postuliert, dass der Transport der Fettsäuren durch die Plasmamembran mit einer Aktivierung zu Acyl-CoA verbunden ist. Die *fat1Δ* Mutante weist entsprechend einen bemerkenswert hohen Anteil (70 %) an freier 18:2- und aktivierter-Fettsäure (60 % 18:2-CoA) auf. Im Gegenzug dazu ist der Prozentsatz (18 %) an veresterter 18:2 gering. In den Mutanten besteht also eine Korrelation zwischen einer Zunahme an freier 18:2 und einer gleichzeitigen Abnahme an der korrespondierenden veresterten Fettsäure. Diese

Akkumulation der freien 18:2 führt zu einem proportionalen Anstieg des Acyl-CoA-Gehaltes. Aufgrund des unterschiedlichen Linolsäure-Anteils in den Stämmen verändert sich auch die Menge der anderen Fettsäuren zueinander (Abb. 25 A). In einem Kontrollexperiment ohne Zugabe von Linolsäure zum Medium unterschieden sich die Anteile der Fettsäuren in den Mutantenstämmen nicht signifikant vom Ausgangsstamm. Daher wurde auf die Darstellung der Deletionsstämmen ohne Linolsäure-Zugabe verzichtet. Der Vergleich der Kontrollstämmen mit und ohne Linolsäure-Zugabe zeigt, wie stark sich das Fettsäuremuster durch die exogene Fettsäure veränderte. Der Anteil der einfach ungesättigten Palmitoleinsäure (16:1) wurde dabei am stärksten beeinflusst. So nahm der Gehalt an 16:1 nach Linolsäure-Fütterung bei den freien Fettsäuren um das 23-fache und bei den veresterten Fettsäuren um das 5-fache zu und im Acyl-CoA-Pool um das 17-fache ab. Darüber hinaus erhöhte sich der Anteil der freien Fettsäuren nach Linolsäure-Zugabe für Palmitinsäure (16:0) um das 2,5-fache, für Stearinsäure (18:0) um das 7-fache und für Ölsäure (18:1) erniedrigte sich der Wert um die Hälfte (Abb. 25 A).

Durch die quantitative Bestimmung des Acyl-CoA-Pools wurde deutlich, dass die Gesamt-Acyl-CoA-Konzentration in den Mutantenstämmen variierte (Abb. 25 B). In den Mutanten *pat1Δ* bzw. *pat1Δ faa2Δ* nahm der Gesamt-Acyl-CoA-Gehalt um etwa das 3-fache im Vergleich zur Kontrolle zu. Die *faa2Δ*-Einzelmutante wies bereits eine 1,5-fach höhere Anhäufung an CoA-Estern auf. Von dem Gesamt-Acyl-CoA-Gehalt erhöhte sich der Anteil von Linoleoyl-CoA in der *pat1Δ*-Mutante um das 12-fache, in der *pat1Δ faa2Δ*-Doppelmutante um das 14-fache und in der *faa2Δ*-Mutante um das 6-fache im Vergleich zur Kontrolle.

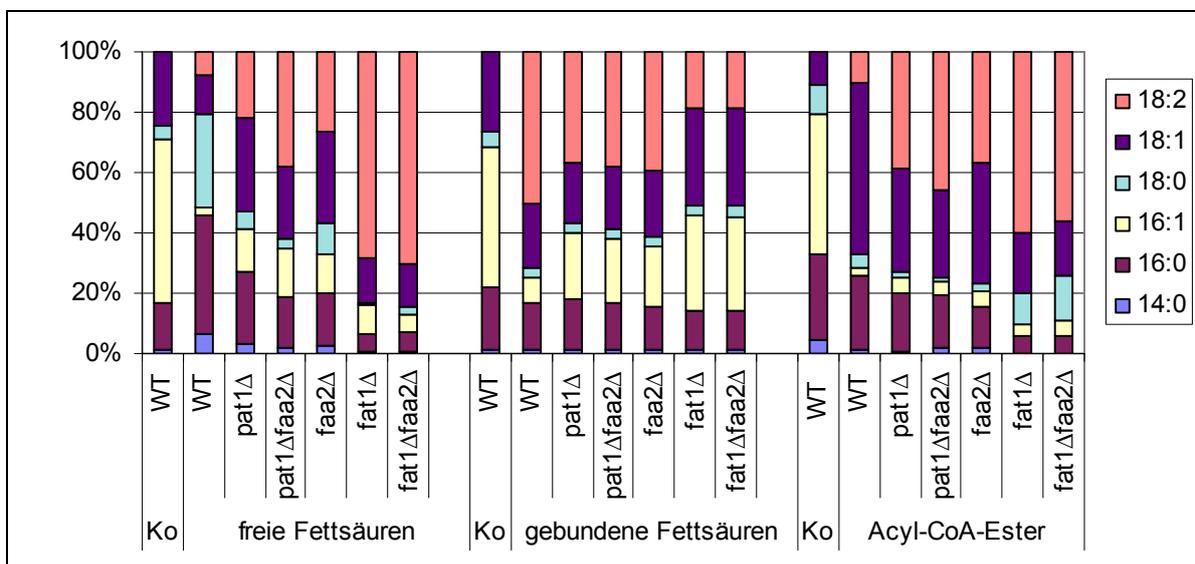
Im Gegensatz dazu stehen die Acyl-CoA-Ester-Mengen der *fat1Δ*- bzw. *fat1Δ faa2Δ*-Mutante. Hier sank die Gesamt-Acyl-CoA-Ester-Menge dieser um mehr als die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise machen von diesem vergleichsweise stark erniedrigten Gesamt-Acyl-CoA-Pool 60 % 18:2-CoA aus. Die Reduktion des Gesamt-Acyl-CoA-Gehaltes in der *fat1Δ* Mutante (2,3-fach) kann mit einer unzureichenden Aktivierung der aufgenommenen Fettsäuren erklärt werden. Die hohen Mengen an transportierter freier Fettsäure deuten daraufhin, dass der Transportprozess selbst nicht beeinträchtigt war, sondern die Umwandlung in Acyl-CoA-Ester. Damit stand der Zelle auch weniger Substrat für die Inkorporation in komplexe Lipide zur Verfügung. Der verhältnismäßig geringe Anteil an veresteter Linolsäure bestätigt diese Aussage. Die Bestimmung der optischen Dichte vor der Zugabe der Linolsäure und nach 24-stündiger Inkubation mit dieser zeigte, dass die Zellzahl der *fat1Δ*-Einzelmutante und des Doppeldeletionsstammes *fat1Δ faa2Δ* konstant blieb

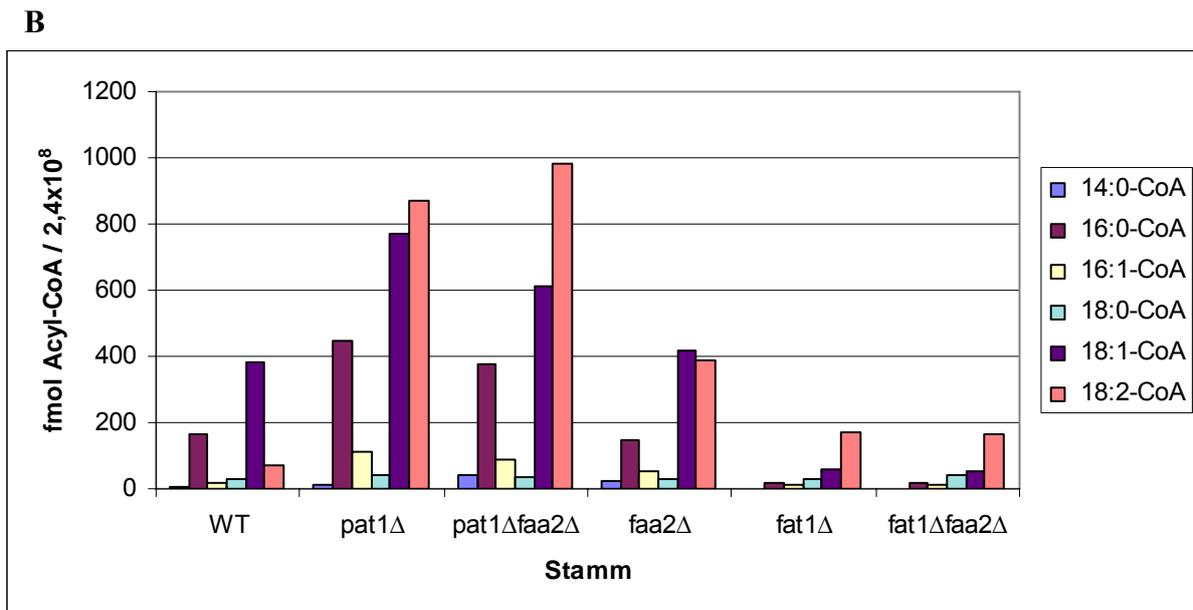
( $OD_{600} \sim 1$ ), während die Zelldichte bei allen anderen Kulturen zunahm ( $OD_{600} \sim 2$ ). Die großen Mengen an freier 18:2 wirkten wahrscheinlich hemmend auf das Wachstum des *fat1Δ* Stammes. Diese Daten unterstreichen die Schlüsselfunktion von Fat1p im Lipidstoffwechsel. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des ABC-Transporters bzw. der peroxisomalen Faa2p ähnlich wie in der Pflanze zu einer Akkumulation von Acyl-CoA-Estern führt. Da sich der prozentuale Anteil von freier Linolsäure in der Doppelmutante *pat1Δfaa2Δ* im Vergleich zu den Einzelmutanten addiert, deutet dies daraufhin, dass Pat1p/Pat2p und Faa2p in zwei unabhängigen Stoffwechselwegen für den Transport von Fettsäuren in die Peroxisomen involviert sind.

**Tabelle 8: Gaschromatographische Analyse der freien und gebundenen Linolsäure in verschiedenen *S. cerevisiae*-Mutanten.** Prozentualer Anteil der Linolsäure an den Gesamtfettsäuren sowie die absoluten Mengen. Diese Untersuchung wurde zweimal durchgeführt. Experimentelle Durchführung siehe Abb. 25

	Anteil an gebundener 18:2-Fettsäure in % (absolute Menge in $\mu\text{g/ml}$ )	Anteil an freier 18:2-Fettsäure in % (absolute Menge in $\mu\text{g/ml}$ )
WT	51 % (221,7 $\mu\text{g/ml}$ )	7 % (0,8 $\mu\text{g/ml}$ )
<i>pat1Δ</i>	36 % (132,4 $\mu\text{g/ml}$ )	22 % (0,8 $\mu\text{g/ml}$ )
<i>pat1Δfaa2Δ</i>	38 % (165,6 $\mu\text{g/ml}$ )	38 % (3,3 $\mu\text{g/ml}$ )
<i>faa2Δ</i>	40 % (103,1 $\mu\text{g/ml}$ )	26 % (0,8 $\mu\text{g/ml}$ )
<i>fat1Δ</i>	18 % (43,2 $\mu\text{g/ml}$ )	68% (18,6 $\mu\text{g/ml}$ )
<i>fat1Δfaa2Δ</i>	19 % (38,1 $\mu\text{g/ml}$ )	71 % (13 $\mu\text{g/ml}$ )

A





**Abb. 25 Einfluss von Linolsäure (18:2) auf den Gehalt von freien, gebundenen und zu Acyl-CoA-Estern aktivierten Fettsäuren in den Stämmen YB332(WT); *pat1Δ*; *pat1Δ faa2Δ*; *faa2Δ*; *fat1Δ*; *fat1Δ faa2Δ*.** Die Zellen wurden für einen Tag in 0,3 %-igem Glukosemedium kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe der Linolsäure (5 mg 18:2/25 ml Kultur) und die weitere Kultivierung der Zellen für 24 h. Zur Beobachtung der Fettsäureverteilung in den Zellen (bei gleicher Ausgangszelldichte) wurden die freien und veresterten Fettsäuren gaschromatographisch bestimmt und die Acyl-CoA-Ester mittels HPLC. **A:** Prozentuale Zusammensetzung der Fettsäuren; Ko ohne Linolsäurezugabe (WT). **B:** Quantitative Analyse der Acyl-CoA-Ester

### 3.10 Fat2p ist in den Fettsäuremetabolismus involviert

Von den sechs bisher bekannten ACS in *S. cerevisiae* sind die Enzyme Faa2p und Fat2p in den Peroxisomen lokalisiert (Hetteema *et al.*, 1996; Blobel und Erdmann, 1996). Die enzymatische Aktivität von Fat2p konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von Fat2p zur zytoplasmatischen ACS Fat1p wird vermutet, dass dieses Protein ebenfalls an dem Transport und der Aktivierung von sehr langkettigen Fettsäuren beteiligt ist. Darüber hinaus ist ein weiterer wichtiger Hinweis für die Funktion von Fat2p im Zusammenhang mit dem Import von Fettsäuren in die peroxisomale Matrix seine Induzierbarkeit durch exogene Fettsäuren (Blobel und Erdmann, 1996).

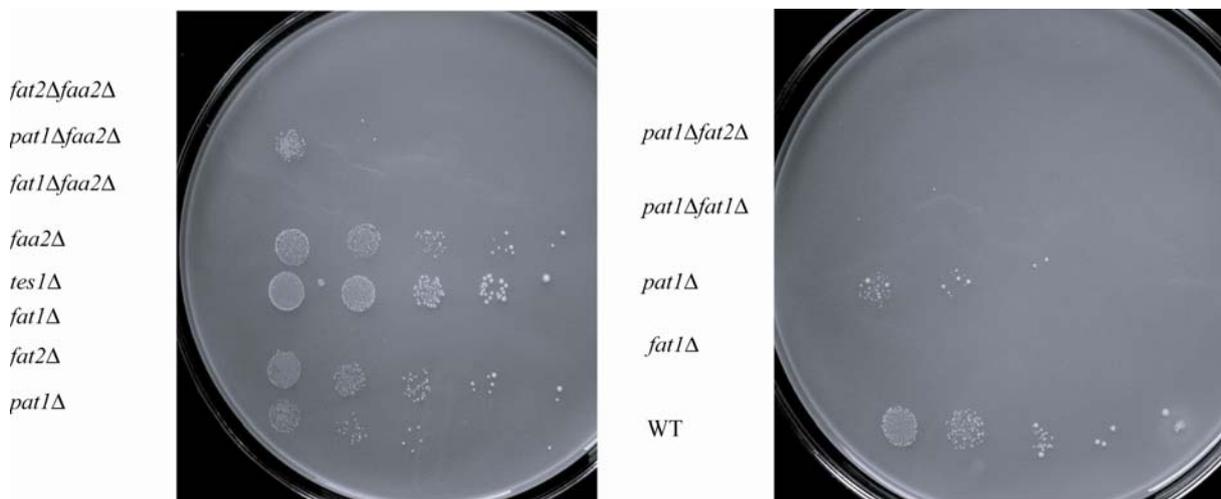
Es sollte nun die Frage geklärt werden, weshalb im Gegensatz zu *A. thaliana* die Aktivierung der Fettsäuren im Peroxisom als Voraussetzung für die  $\beta$ -Oxidation in *S. cerevisiae* entbehrlich zu sein scheint. Der Nachweis der ACS-Funktion von Fat2p könnte den

Unterschied zwischen den bisherigen Importmodellen von Fettsäuren in die Peroxisomen von Pflanze und Hefe aufheben.

### **3.10.1 Eine Deletion des *FAT2*-Gens führt zu einem synthetisch letalen Wachstumsphänotyp in Kombination mit einer *PAT1*- als auch mit einer *FAA2*-Deletion**

Zur Überprüfung der Bedeutung des *FAT2*-Gens für den Transport bzw. für die Aktivierung von Fettsäuren in Peroxisomen wurde die *fat2Δ*-Deletionsmutante (Scharnewski, Universität Göttingen) untersucht. Die Mutante sollte zeigen, ob ein Funktionsausfall von *FAT2* zu einem Wachstumsphänotyp auf Ölsäure-haltigem Medium führt. Bei der Deletionsmutante wurde der offene Leserahmen des *FAT2*-Gens (YBR222C) durch ein *hygMX4*-Modul ersetzt (2.8.3). In einen Wachstumsversuch (2.4) mit der *fat2Δ*-Mutante konnte jedoch ein mit dem Ausgangsstamm vergleichbares Wachstum beobachtet werden (Abb. 26). Daraufhin wurde zusätzlich das *PAT1*-Gen bzw. das *FAA2*-Gen auf die oben beschriebene Weise deletiert und wiederum das Wachstumsverhalten untersucht. Die Doppeldelentionsmutanten *fat2Δ pat1Δ* und *fat2Δ faa2Δ* waren nicht in der Lage auf Ölsäure-haltige Agarplatten zu wachsen. Da die entsprechenden Einzelmutanten normales bzw. nur eingeschränktes Wachstum (*pat1Δ*) zeigen und erst die Kombination beider Mutationen für die Hefezelle letal ist, spricht man von synthetisch letalen Phänotypen (Abb. 26). Der Versuch die zwei *fat2*-Doppelmutanten auf demselben Medium mit einem plasmidkodierten *FAT2*-Gen (pYCG-*FAT2*, Euroscarf) unter der Kontrolle des endogenen Promotors zu komplementieren, war wie im Falle von *PAT1* (3.8.3) nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde das Wachstumsverhalten der *fat1Δ*-Mutante getestet. Die Deletion des *FAT1*-Gens war ebenfalls für die Hefezellen letal. Erwartungsgemäß verhielten sich die Doppeldelentionsmutanten *fat1Δ faa2Δ* und *pat1Δ fat1Δ* wie die *fat1Δ*-Einzelmutante unter diesen Bedingungen (Abb. 26). Dies zeigt, dass für das Wachstum der Zellen in Gegenwart von Ölsäure die Aktivität der zytoplasmatischen ACS Fat1p essentiell ist. Damit wird erneut die wichtige Rolle der ACS Fat1p im Fettsäuremetabolismus unterstrichen. Diese Daten zeigen darüber hinaus, dass die Funktion von Fat2p bei gleichzeitiger Deletion von *PAT1* bzw. *FAA2* für die Zelle unter den getesteten Wachstumsbedingungen essentiell ist. Es ist davon auszugehen, dass die  $\beta$ -Oxidation in den Doppelmutanten nicht mehr funktional ist und Fat2p damit eine ganz entscheidende Rolle im Aktivierungsprozess von langkettigen Fettsäuren übernimmt. Damit wäre eine Aktivierung von Fettsäuren in *S. cerevisiae* in den Peroxisomen ebenso essentiell wie in der Pflanze.

Zur Verifizierung dieser Annahme sollten die  $\beta$ -Oxidationsprodukte der zwei Doppeldeletionsmutanten gemessen werden (van Roermund *et al.*, 1995). Eine Bestätigung der Ergebnisse durch diesen Test, würde eine Adaption dieser neuen Erkenntnisse auf das bisherige Importmodell von Fettsäuren in Peroxisomen erfordern. Demnach wäre es nunmehr fraglich, ob der Pat1p/Pat2p Transporter auch tatsächlich aktivierte Fettsäuren transportiert, da eine Aktivierung der Fettsäuren in den Peroxisomen für das Wachstum der Hefezellen notwendig zu sein scheint. Denkbar wäre allerdings auch die Spaltung der transportierten CoA-Ester durch eine Thioesterase, wobei die resultierenden freien Fettsäuren eine erneute Aktivierung der Fettsäuren erfordern, um als Substrat für die  $\beta$ -Oxidation bereitzustellen. Im nächsten Kapitel wird daher die peroxisomale Thioesterase Tes1p vorgestellt.



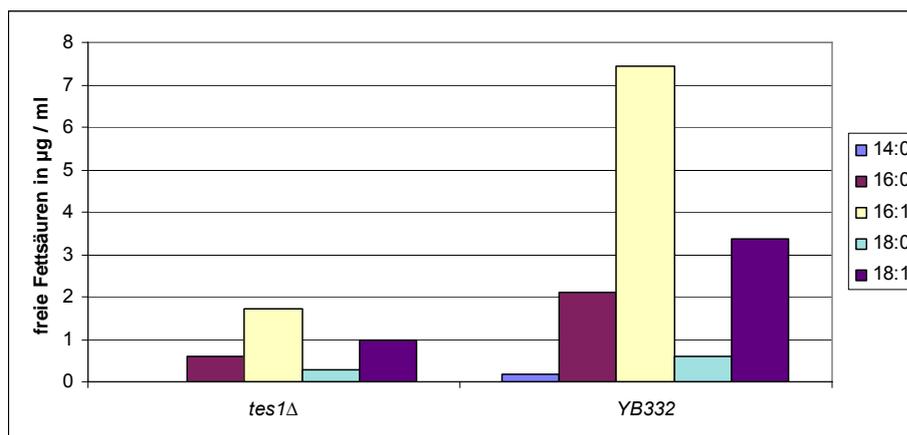
**Abb. 26 Wachstumsanalyse verschiedener Hefemutanten auf Ölsäure-haltigem Minimalmedium.** Aus einer 1-tägigen Vorkultur in 0,3 % igen Glukose-Minimalmedium wurden die Zellen auf eine  $OD_{600}=0,1$  mit sterilem A. dest. eingestellt und anschließend in 1:10 Verdünnungsschritten weiter verdünnt. 5  $\mu$ l der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden auf eine Agarplatte (0,1 % Ölsäure) getropft und für ca. 1 Woche bei 30 °C inkubiert.

### 3.10.2 Das Wachstum auf Oleatmedium in *S. cerevisiae* ist unabhängig von Tes1p

Eine Reihe von Proteinen wird durch das Wachstum auf Ölsäure-haltigen Medium induziert. Zu diesen Proteinen zählt auch die peroxisomale Acyl-CoA-Thioesterase Tes1p (Jones *et al.*, 1999). Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von Acyl-CoA-Estern zu freien Fettsäuren und CoA. Tes1p macht den Hauptteil der Thioesteraseaktivität in den Zellen aus. Die genaue Funktion von Tes1p ist nicht bekannt. Nach dem bisherigen Verständnis reguliert Tes1p den CoA-Pool in den Peroxisomen. Die Funktion könnte auch darin bestehen, dass Tes1p die

durch den ABC-Transporter Pat1p/Pat2p transportierten Acyl-CoA-Ester spaltet, da eine anschließende Aktivierung durch die peroxisomalen ACS Faa2p bzw. Fat2p notwendig ist. Diese Annahme erscheint ungewöhnlich, jedoch lassen die bisherigen Ergebnisse diese Hypothese zu. In einem Wachstumstest auf Oleatplatten sollte überprüft werden, ob die *tes1*-Mutante noch in der Lage ist zu wachsen (2.4). In der Abb. 26 ist das Wachstum der *tes1*-Mutante (BY4741, *tes1Δ::kanMX4*) sichtbar. Die Mutante verhält sich dabei wie die Kontrolle YB332. Der Befund legt die Vermutung nahe, dass es entweder noch eine weitere Acyl-CoA-Thioesteraseaktivität in den Peroxisomen gibt, was unsere Hypothese unterstützen würde, oder dass nicht wie bisher angenommen Acyl-CoA-Ester von Pat1p/Pat2p transportiert werden, sondern freie Fettsäuren.

Die gaschromatographische Bestimmung der freien Fettsäuren in *tes1Δ*-Zellen zeigte eine deutliche Verringerung (3,8-fach) des gesamten freien Fettsäure-Pools im Vergleich zur Kontrolle (2.20; Abb. 27). Die Zellen wurden dafür zwei Tage in Minimalmedium mit 0,3 % Glukose angezogen (2.4). Da dem Medium keine Fettsäure beigefügt wurde, ist nicht von einer Induktion von *TES1* auszugehen. Die Deletion von *TES1* und die daraus resultierende herabgesetzte Thioesteraseaktivität führte erwartungsgemäß zu niedrigen freien Fettsäuremengen. Es wäre interessant zu wissen, ob sich die Differenz des Gehaltes an freien Fettsäuren in den beiden Stämmen nur auf die Menge der in den Peroxisomen vorkommenden Fettsäuren bezieht.

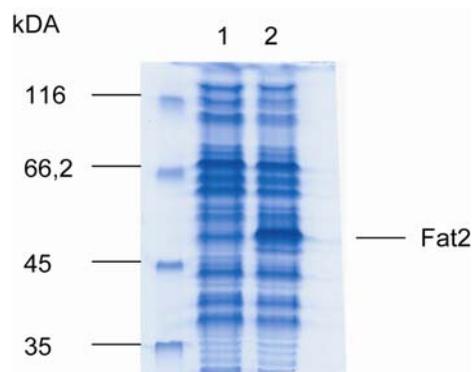


**Abb. 27 Einfluss von *TES1* auf den Gehalt freier Fettsäuren.** Nach dem Wachstum der Stämme für 2 Tage in Minimalmedium mit 0,3 % Glukose bei 30 °C wurden die Zellen geerntet und einer gaschromatographischen Analyse unterzogen. Diese Untersuchung wurde zweimal durchgeführt.

### 3.10.3 Nachweis der ACS-Aktivität von Fat2p

Nachdem die Wachstumsversuche auf Ölsäure-haltigem Medium gezeigt haben, das Fat2p eine wichtige Rolle in der Metabolisierung exogener Fettsäuren spielt, sollte nun das Substratspektrum des Fat2p Enzyms überprüft werden. Dazu wurde *FAT2* in dem ACS-defizienten-*E. coli*-Stamm K27(*fadD*) exprimiert und die ACS-Aktivität des Zellextraktes für verschieden lange radioaktiv markierte Fettsäuren gemessen.

Als erstes wurde der *FAT2*-ORF mit den Primern FAT2f und FAT2r amplifiziert und als *NdeI/NotI*-Fragment in den pET28a-Vektor ligiert. Als Matrize für die PCR-Reaktion wurde das pYCGFAT2-Plasmid verwendet. Das fertige Expressionskonstrukt wurde anschließend für eine Transformation der kompetenten *E. coli fadD*-Mutante verwendet (2.8.1). Als Negativkontrolle wurde der Leervektor eingesetzt. Die transformierten Zellen wurden bis zur logarithmischen Phase bei 37 °C angezogen, mit IPTG (1 mM) induziert und nach 3 h durch Zentrifugation sedimentiert (2.12.1.1). Die Zellen wurden durch eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und erneut zentrifugiert. Der lösliche Überstand stand nun für die ACS-Messung bereit. Zuvor wurde jedoch die Expression von Fat2p überprüft, indem ein Aliquot der Proteinfractionen in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurde (2.12.4; Abb. 28). Das theoretisch berechnete Molekulargewicht für Fat2p beträgt 60,5 kDa. Anhand der relativen Laufweite der Markerbanden ließ sich die heterologe Expression von Fat2p als eine stärker hervortretende Bande in der Spur 2 nachweisen.



**Abb. 28: SDS-PAGE zum Nachweis der Fat2p-Expression in *E. coli* K27(*fadD*)-Zellen.** Die Gesamtproteinfractionen wurden nach elektrophoretischer Trennung im 10 %-igen SDS-Gel durch Coomassie-Blau angefärbt. Die Größen des Molekulargewichtsmarkers sind links angegeben. Als Kontrolle diente ein Stamm der mit dem Leerplasmid pET28a transformiert wurde (Spur 1) und in Spur 2 ist die durch das Plasmid pET28a*FAT2* kodierte Expression von Fat2p sichtbar.

Für die ACS-Bestimmung wurden 4 µg der Gesamtproteinfraktion eingesetzt (2.24.2). Die während des Enzymtests entstandenen Acyl-CoA-Ester wurden aus den Ansätzen extrahiert und ihre Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 9 zusammengefasst. Für die mittelkettige Fettsäure 12:0 konnte keine Aktivität von Fat2p nachgewiesen werden. Im Falle für die langkettigen Fettsäuren 18:0 und 18:1 war eine sehr geringe Aktivität von 30,8 bzw. 19,6 fmol (mg Protein)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> messbar, wobei die *E. coli*-Zellen, die mit dem Leerplasmid transformiert wurden, auch Aktivität gegenüber 18:1 (14,78 fmol (mg Protein)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) aufwiesen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der *fadD*-*E. coli* Stamm doch noch eine gewisse Restaktivität aufweist oder dass die extrahierte Acyl-CoA-Ester-Phase durch Spuren der organischen Phase kontaminiert war. Leicht erhöhte Aktivität zeigt Fat2p für die langkettige Fettsäure 20:0 mit 78 fmol (mg Protein)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Aufgrund der sehr geringen Enzymaktivität von Fat2p gegenüber langkettigen Fettsäuren ist jedoch davon auszugehen, dass diese Aktivität von geringer physiologischer Relevanz ist.

**Tabelle 9: Fat2-Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität im Zellextrakt von *E. coli* K27(*fadD*)-Zellen.**

Fettsäure	Spezifische Aktivität in fmol (mg Protein) <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	
	<i>fadD</i>	<i>fadDFAT2</i>
12:0	-	-
18:0	-	30,8
18:1	14,78	19,6
20:0	-	78

## 4. Diskussion

### 4.1 Ist eine verstärkte Fettsäureelongation ein generelles Merkmal einer beeinträchtigten $\beta$ -Oxidation?

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus des Fettsäureimports in pflanzliche Peroxisomen untersucht. Dabei stand die Rolle des membranintegralen ABC-Transporters PXA1 und dessen Zusammenwirken mit den beiden peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 und LACS7 im Mittelpunkt. Vorranggegangene Studien hatten bereits gezeigt, dass sowohl die Funktion des PXA1-Transporters als auch die peroxisomale Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität essentiell für die Keimlingsentwicklung sind (Fulda *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2000; Zolman *et al.*, 2001). Nur durch Zugabe von exogenem Zucker zum Wachstumsmedium sind sowohl *pxa*-Mutanten als auch die Doppelmutante *lacs6 lacs7* von *Arabidopsis thaliana* in der Lage, sich als Keimlinge zu etablieren. Während der Keimung werden die in Form von TAG gespeicherten Lipide metabolisiert und somit der Keimling mit Kohlenstoffgerüsten und Energie versorgt. Für die Degradation der aus dem TAG freigesetzten Fettsäuren ist es zunächst erforderlich, dass diese an den Ort des Fettsäureabbaus transportiert werden. Dazu müssen die Fettsäuren die peroxisomale Membran passieren und als Acyl-CoA-Ester aktiviert werden, um im Anschluss als Substrat für die  $\beta$ -Oxidation fungieren zu können. In den PXA1 -Mutanten *cts1* und *cts2* als auch in der *lacs6 lacs7*-Doppelmutante ist der TAG-Abbau inhibiert (Footitt *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2004). Dieser Abbau von Speicherlipiden wurde anhand der Bestimmung der ausschließlich in diesen Lipiden vorkommenden Eicosensäure (20:1) verfolgt. Interessanterweise sind die *lacs6 lacs7*-Mutante als auch die *cts1*- bzw. *cts2*-Mutante noch zu einem stark verlangsamten Abbau von 20:1 während der frühen Keimlingsentwicklung in Gegenwart von Zucker befähigt (Footitt *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2004). Es wurde daher in dieser Studie die Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* erzeugt, um zu überprüfen, ob sich die Funktionen der peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 und LACS7 sowie des ABC-Transporters PXA1 einander komplementieren. Die gemeinsame Deletion der Aktivitäten von LACS6, LACS7 und PXA1 führte jedoch nicht zu einer weiter verlangsamten oder sogar völlig unterbliebenen Abnahme der Fettsäuren, sondern zeigte vergleichbare Werte zu den Ausgangslinien. Daher wird geschlossen, dass es sich bei PXA1 sowie den peroxisomalen LACS6 und LACS7 um aufeinander folgende Komponenten eines Stoffwechselweges handelt.

Unter der Annahme, dass PXA1 freie Fettsäuren transportiert, könnten diese von den peroxisomalen LACS6 oder LACS7 zu Acyl-CoA-Estern aktiviert werden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in der PXA1-Transportermutante *pxa1-2* neben langkettigen Acyl-CoA-Estern auch freie langkettige Fettsäuren akkumulieren. Die Akkumulation von freien Fettsäuren könnte zu einer verstärkten Bildung von Acyl-CoA-Ester durch zytoplasmatische Acyl-CoA-Synthetasen führen. Die theoretisch auch durch einfache Diffusion in die Peroxisomen der *pxa1-2*-Mutante eindringenden Fettsäuren könnten durch die peroxisomalen LACS aktiviert werden. In diesem Fall sollte sich jedoch der Fettsäureabbau durch die  $\beta$ -Oxidation direkt anschließen. Die Akkumulation von freien Fettsäuren in der Transportermutante deutet jedoch daraufhin, dass der Fettsäuretransport in die Peroxisomen durch einfache Diffusion in Pflanzen nur zu einem geringen Anteil erfolgt.

Es wäre jedoch auch denkbar, dass PXA1 neben freien Fettsäuren auch Acyl-CoA-Ester transportiert. In Liposomenstudien konnte gezeigt werden, dass Acyl-CoA-Ester *per se* nicht membrangängig sind. Daraus lässt sich schließen, dass für den Membrantransfer von Acyl-CoA-Estern Transportproteine benötigt werden. Das macht die Beteiligung von PXA1 an diesem Transport wahrscheinlicher. Darüber hinaus haben bereits Untersuchungen des Fettsäureimports in Peroxisomen von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, dass der für den Import von langkettigen Fettsäuren verantwortliche ABC-Transporter Pat1p/Pat2p spezifisch für zytoplasmatisch generiertes Acyl-CoA ist. Unter der Annahme, dass PXA1 Acyl-CoA-Ester transportiert, erscheint die Notwendigkeit einer erneuten Aktivierung von Fettsäuren durch LACS6 bzw. LACS7 zunächst paradox. Möglicherweise wird während des Transportes der CoA-Rest durch eine Thioesterase abgespalten, und die in die peroxisomale Matrix gelangte freie Fettsäure benötigt eine neuerliche Aktivierung durch LACS6 bzw. LACS7. Ein weiterer Hinweis dafür, dass PXA1 Acyl-CoA-Ester als Substrate akzeptiert, ergibt sich aus der Akkumulation von langkettigen Acyl-CoA-Estern in den Transportermutanten *cts1* und *cts2* (Footitt *et al.*, 2002).

Dem verzögerten Abbau von 20:1 in der Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* könnte ein noch unbekannter Transportmechanismus in die Peroxisomen zu Grunde liegen. Da in dieser Mutante die peroxisomale LACS-Aktivität nicht vorhanden ist, könnten eindringende Fettsäuren nicht zu Thioestern aktiviert werden und stünden damit der  $\beta$ -Oxidation nicht zur Verfügung. Die Möglichkeit, dass ein anderes Transportprotein die Translokation von Acyl-CoA-Estern vermittelt, wird als gering eingeschätzt. Sequenzanalysen zeigten, dass neben PXA1 nur ein weiteres Protein zur ABCD-Subfamilie in *A. thaliana* gehört (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Es bestünde also die Möglichkeit, dass das von *AtPMP1* (At1g54350)

kodierte Protein die Funktion eines Acyl-CoA-Transporters übernimmt. Die Peptidsequenz dieses Proteins enthält jedoch ein plastidäres Lokalisierungssignal, was vielmehr auf eine Funktion in den Chloroplasten hindeutet.

Die bisherigen Untersuchungen zum TAG-Abbau der Dreifachmutante deuten auf einen Degradationsprozess hin, der wahrscheinlich unabhängig von der  $\beta$ -Oxidation erfolgt. In diesem Zusammenhang wurde die  $\alpha$ -Oxidation als ein möglicher alternativer Abbauweg untersucht. Die Suche nach Intermediaten der  $\alpha$ -Oxidation ergab jedoch keinen Hinweis auf eine erhöhte  $\alpha$ -Oxidation in der Dreifachmutante. Die physiologische Rolle der  $\alpha$ -Oxidation von Fettsäuren ist in Pflanzen bisher nicht bekannt. In keimenden Samen von *Pisum sativum* sowie pathogenbehandelten bzw. verwundeten Pflanzen von *Nicotiana tabacum* und *A. thaliana* konnte ein  $\alpha$ -Dioxygenase-Aktivität nachgewiesen werden (Saffert *et al.*, 2000; Hamberg *et al.*, 1999, Hamberg *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Daten wird vermutet, dass der  $\alpha$ -Oxidation von Fettsäuren eine Funktion während der Keimung sowie bei biotischem und abiotischem Stress zukommt. Die subzelluläre Lokalisation der  $\alpha$ -Oxidation in Pflanzen ist nicht bekannt und wird in Säugern kontrovers diskutiert. Es wurde eine Aktivität in den Mitochondrien (Watkins und Mihalik, 1990) als auch in den Peroxisomen nachgewiesen (Jansen *et al.*, 2001). Möglicherweise konnte also keine erhöhte  $\alpha$ -Oxidation in der Dreifachmutante nachgewiesen werden, da dieser Prozess ebenfalls in den Peroxisomen stattfindet.

Die Bestimmung der Gehalte an Acyl-CoA-Estern während der frühen Keimlingsentwicklung in der Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* zeigte eine deutliche Anhäufung von sehr langkettigen Acyl-CoA-Estern. Diese Akkumulation konnte bis auf 18:0-CoA nicht für Acyl-CoA-Ester der Kettenlänge C16 bis C18 beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass diese Acyl-CoAs direkt in die im ER lokalisierte Lipidsynthese eingehen. Dagegen ist 20:1 kein Substrat dieser Lipidsynthese und kann deshalb in Membranlipiden nicht nachgewiesen werden. So könnte die frühe Akkumulation von 20:1-CoA in der Dreifachmutante bzw. den Ausgangslinien darauf zurückzuführen sein, dass diese Fettsäure hier weder  $\beta$ -oxidiert noch alternativ in die Lipidsynthese einfließen kann. Demgegenüber steht die spätere verlangsamte Abnahme an 20:1-CoA und parallele Akkumulation an 22:1-CoA sowie von sehr langkettigen Acyl-CoAs der Kettenlänge C24 bis C28. Die bislang unverstandene Abnahme der aus dem TAG stammenden 20:1 während der Keimung könnte somit anstelle von Degradation vielmehr in der Elongation dieser Fettsäure zu längerkettigen Fettsäuren begründet sein. Bisher wurde die langsame Abnahme von 20:1 mit einer verbleibenden  $\beta$ -Oxidationsaktivität erklärt, ohne dass verstanden wurde, welche alternativen Mechanismen den Transport bzw. die

Aktivierung der Fettsäure in Peroxisomen bewerkstelligen können. Wenn stattdessen die Abnahme der Fettsäure auf einen anabolen Stoffwechselweg beruhen sollte, wäre der Verlust von PXA1 und LACS6 und LACS7 mit dem vollständigen Ausfall der  $\beta$ -Oxidation verbunden.

Sehr langkettige Acyl-CoA-Ester spielen eine wichtige Rolle in der Sphingolipidbiosynthese (bis C24) und der Wachssynthese (bis C34) in Pflanzen (Übersicht bei: Kunst und Samuels, 2003). Es wäre also denkbar, dass aufgrund des deletierten Stoffwechselweges von PXA1 und LACS langkettige Acyl-CoAs wie 20:1-CoA verstärkt elongiert werden und in diese beiden Biosynthesewege einfließen. Zusätzliche Studien sind jedoch notwendig, um eindeutig den Verbleib der sehr langkettigen Acyl-CoA-Ester zu bestimmen. Eine genaue Analyse der Kutikula bzw. epikutikulären Wachsschicht und der Sphingolipidfraktion könnte dabei hilfreich sein.

Die neurodegenerative Erkrankung X-ALD des Menschen ist ebenfalls durch die Akkumulation von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren mit hoher Kettenanzahl (VLCFAs) und einer reduzierten  $\beta$ -Oxidationsaktivität gekennzeichnet. Untersuchungen an Fibroblasten von X-ALD-Patienten haben gezeigt, dass die Elongation der VLCFAs erhöht war. Plasmaanalysen von Patienten mit X-ALD und verschiedenen anderen peroxisomalen  $\beta$ -Oxidationserkrankungen offenbarten eine erhöhte Konzentration an VLCFAs bis zu einer Kettenlänge von C32 (Kemp *et al.*, 2005).

Diese Daten deuten daraufhin, dass die verstärkte Fettsäureelongation ein allgemeines Merkmal für eine beeinträchtigte  $\beta$ -Oxidation zu sein scheint. In wieweit die verstärkte Elongation von langkettigen Fettsäuren mit der Mutation des ABC-Transporters gekoppelt ist, kann hierbei nur spekuliert werden. Möglicherweise steht durch die Akkumulation von VLCFAs oder VLCFA-CoAs der Elongationsmaschinerie mehr Substrat zur Verfügung. Darüber hinaus könnte die unregulierte Kettenverlängerung aus einem Ungleichgewicht zwischen der Biosynthese und der Degradation von VLCFAs resultieren.

#### **4.2 Expressionsanalysen von LACS und PXA1 lassen auf eine vom TAG-Abbau unabhängige Stoffwechselaktivität während der Keimung schließen**

In *A. thaliana* sind neun Gene bekannt, die für LACS-Proteine kodieren (Fulda *et al.*, 2002). Die in dieser Studie durchgeführte Expressionsanalyse der neun *LACS*-Gene des Ökotyps WS zeigte, dass während der Keimung neben den zwei peroxisomalen LACS6 und LACS7 auch weitere zytoplasmatische LACS exprimiert werden. Somit können aus dem TAG freigesetzte

Fettsäuren durch zytoplasmatische LACS aktiviert werden und dem PXA1-Transporter sowohl als freie als auch als aktivierte Fettsäuren zur Verfügung gestellt werden. Unter der Annahme, dass nur die peroxisomalen LACS in der Keimlingsentwicklung aktiv sind, wäre eine Aktivierung der Fettsäuren im Zytosol nicht möglich und dem PXA1-Transporter ständen nur freie Fettsäuren zur Translokation zur Verfügung. Die Expressionsstudie belegt jedoch auch die Expression der zytoplasmatischen LACS1, LACS2 und LACS4 während der Keimlingsentwicklung. Bisher ist über die Funktion und die subzelluläre Lokalisation von LACS1 und LACS4 nichts bekannt. Es lässt sich jedoch vermuten, dass diese membrangebundenen Enzyme eine Rolle in der  $\beta$ -Oxidation bzw. der Biosynthese von Membranlipiden für den expandierenden Embryo spielen.

Für LACS2 wird eine Funktion bei der Bildung von Hydroxyfettsäure-CoA-Intermediaten der Synthese von Kutin bzw. kutikulärer Wachse postuliert (Schnurr *et al.*, 2004). Die reduzierte Keimungsrate der *lacs2*-Mutante deutet jedoch auch auf eine Funktion von LACS2 im Keimungsprozess hin. In einer Studie von Shockey *et al.* (2000) wurden die Substratspezifitäten der neun LACS-Gene bestimmt. Die zytoplasmatische LACS2 wies dabei keine Aktivität für die TAG-spezifische 20:1-Fettsäure auf. Damit kann eine Funktion dieses Proteins während des Abbaus von 20:1 ausgeschlossen werden. Für die Proteine LACS1 und LACS4 konnte jedoch eine Aktivität gegenüber 20:1 nachgewiesen werden. Damit kann eine Beteiligung dieser beiden Acyl-CoA-Synthetasen am Abbau der Speicherlipide nicht ausgeschlossen werden. Die mit Abstand höchste 20:1-Aktivität verzeichneten jedoch die peroxisomalen LACS6 und LACS7. Damit wird die wichtige Rolle der LACS im Aktivierungsprozess von 20:1 unterstrichen. Die beiden peroxisomalen LACS werden bereits am Tag der Aussaat exprimiert. Dabei ist zu beachten, dass das Saatgut vor der Aussaat für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert wurde. Durch die Wasseraufnahme begann bereits in dieser Zeit die Keimung, die mit dem Einsetzen zahlreicher Stoffwechselaktivitäten verbunden gewesen sein wird. Im Gegensatz zur peroxisomalen LACS-Expression zeigen die Daten des 20:1-Abbaus im Ökotyp WS, dass der TAG-Abbau erst am 2. Tag nach der Aussaat begann. Diese Daten deuten daraufhin, dass LACS6 und LACS7 eine weitere peroxisomale Funktion zukommt, die nichts mit dem TAG-Abbau zu tun hat. Die Expressionsanalyse von Footitt *et al.* (2002) belegte ebenfalls die starke Expression von PXA1 während der frühen Keimungsphase. Im Gegensatz zu dem PXA1-Transportermutanten ist die Funktion der beiden peroxisomalen LACS für das Durchbrechen der Samenruhe nicht essentiell, da die Doppelmutante *lacs6 lacs7* in der Lage ist zu keimen. Diese Beobachtung legt den Schluss

nahe, dass PXA1 und die peroxisomale LACS unterschiedliche Aufgaben beim Übergang von der Samenruhe zur Keimung haben.

Zur genaueren Analyse der gewebespezifischen Expression von PXA1 und LACS7 wurden Promotor-GUS-Analysen durchgeführt. Mit diesem Versuch konnte die Aktivität der Promotoren von LACS7 und PXA1 in verschiedenen Entwicklungsphasen *in planta* aufgezeigt werden. Die Expressionsmuster der transgenen *LACS7::GUS*- bzw. *PXA1::GUS*-Linien während der Keimlingsentwicklung zeigten deutliche Übereinstimmungen, waren aber nicht deckungsgleich. Die Promotoren von LACS7 und PXA1 sind bereits vor Beendigung der Keimung aktiv, wenn die Wurzel durch die Samenschale tritt. Diese Daten bestätigen damit sowohl das durch die RT-PCR-Analyse erstellte Expressionsprofil von LACS7 als auch die *in silico* Mikroarrayanalyse von Geneinvestigator (<http://geneinvestigator.eth.ch>). Während der Keimung wurde eine höhere Promotoraktivität von LACS7 im Vergleich zu PXA1 beobachtet. Während die Expression von PXA1 wahrscheinlich nur auf die Kotyledonen beschränkt ist, konnte im intakten Samen die LACS7-Aktivität in der gesamten Samenschale detektiert werden. Wie bereits für die RT-PCR-Daten der peroxisomalen LACS diskutiert, könnte diese frühe Aktivität einem Stoffwechselweg zu kommen, der unabhängig von der Degradation der Speicherlipide erfolgt. Da auch die PXA1-Promotor-Analyse diese sehr frühe Aktivität in der Keimungsphase aufzeigte, könnte die Transporteraktivität einem alternativen Substrat zukommen. Durch Dünnschnittpräparate könnte eine noch bessere Unterscheidung der Aktivitätsverteilung im Embryonen der *PXA1::GUS*- bzw. *LACS7::GUS*-Linien erzielt werden. Während der Nachkeimungsphase sind die Promotoraktivitäten der beiden Gene sehr ähnlich. Nur in der Wurzel gibt es einen Unterschied. Im Gegensatz zur *LACS7::GUS*- Linie zeigte die *PXA1::GUS*-Linie eine Aktivität in der Wurzel. Ein Merkmal der Transportermutante *pxa1-1* ist seine reduzierte Ausbildung von Seitenwurzeln (Zolman *et al.*, 2001). Diese Daten führen zu der Annahme, dass PXA1 für das Wachstum der Wurzel notwendig ist und dass das transportierte Substrat möglicherweise die Aktivierung von LACS7 nicht benötigt. ABC-Transporter zeichnen sich durch ein breites Substratspektrum aus. Für den PXA1-Transporter konnte bisher gezeigt werden, dass dieser zusätzlich in den Transport der Auxinvorstufen 2,4-Dichlorphenoxybutyrat (2,4 DB) und Indol-3-butyrsäure (IBA) involviert ist (Zolman *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2002). Somit ist davon auszugehen, dass PXA1 neben dem Transport von langkettigen Fettsäuren andere Substrate in einem LACS7-unabhängigen Stoffwechselweg transportieren kann.

Die Aktivität der PXA1- und LACS7-Promotoren wurden auch in reproduktiven Organen nachgewiesen. Interessanterweise zeigten RT-PCR-Daten von Shockey *et al.* (2002), dass alle

neun LACS-Gene in Blüten exprimiert werden. Dieser Befund lässt auf einen ausgeprägten Acyl-CoA-Metabolismus in diesem Pflanzenorgan schließen. Auch andere Proteine, die im Lipidmetabolismus eine Rolle spielen, werden in Blütengeweben exprimiert (Engeseth *et al.*, 1996; Dormann *et al.*, 2000). Da der PXA1-Promotor in diesen Geweben ebenfalls aktiv ist, könnte über eine gemeinsame Funktion von Transporter und peroxisomalen LACS während der Blütenentwicklung spekuliert werden. Ausserdem wurde eine starke Aktivität beider Promotoren in Rosettenblättern nachgewiesen. Dabei sind die Aktivitätsmuster in jungen Blättern gleich. Wohingegen sich die Aktivitäten von LACS7 und PXA1 in seneszenten Blättern geringfügig unterscheiden. Da die Seneszenz in Blättern mit einem starken Abbau von Membranlipiden einhergeht, ist das Zusammenwirken von peroxisomalen LACS und dem PXA1-Transporter bei diesem Vorgang sehr wahrscheinlich.

Beginnend mit der Samenkeimung über die Wachstums- und Reifephase bishin zur reproduktiven Phase und der Seneszenz konnte die Promotoraktivität von LACS7 und PXA1 gezeigt werden. Damit wird die weitreichende Bedeutung dieser beiden Proteine unterstrichen. Die Funktion der peroxisomalen LACS und des PXA1-Transporters ist jedoch mit der Ausnahme der Keimlingsentwicklung nicht essentiell für die weitere Entwicklung der Pflanze.

#### **4.3 Die Fähigkeit zum Brechen der Dormanz ist nicht an eine Domäne des PXA1-Transporters gekoppelt**

Der Übergang von der Embryonalentwicklung zur Keimung wird durch Kontrollmechanismen reguliert. So konnten in *A. thaliana* mehrere Gene identifiziert werden, die das Reifen des Embryos begünstigen und über die Aufrechterhaltung der Samenruhe entscheiden (Holdsworth *et al.*, 1999; Koorneef *et al.*, 2000). Der PXA1-Transporter fördert das Keimungspotential und abhängig von der Position und Art einer Mutation in dem *PXA1*-Gen wurden in der Literatur unterschiedliche Keimungsphänotypen beschrieben (Russel *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2002; Zolman *et al.*, 2001). Ausgehend von dieser unterschiedlichen Keimungsbereitschaft der Transportermutanten wurde in dieser Studie postuliert, dass der potentielle erste Halbtransporter, möglicherweise in Form eines Dimers, für das Durchbrechen der Samenruhe benötigt wird. Die Untersuchung der Keimungsfähigkeit verschiedener Transportermutanten konnte diese Annahme jedoch nicht bestätigen. Die Linie *pxa1-2* trägt eine T-DNA-Insertion im zweiten potentiellen Halbtransporter und könnte somit den funktionellen ersten Halbtransporter exprimieren. Das Keimungsverhalten dieser Linie

unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von den Mutanten *cts1* und *cts2*, die ihre Mutation im Bereich des ersten potentiellen Halbtransporters tragen.

Weitere Keimungsstudien konnten zeigen, dass das Keimungspotential der *cts1*-, *cts2*- bzw. *pxa1-2*-Mutanten in Gegenwart von Zucker auf Wasseragar im Vergleich zu MS-Medium stark reduziert war. Das MS-Medium enthält zusätzliche Makroelemente, Mikroelemente und Vitamine. Darin machen die Makroelemente Ammoniumnitrat und Kaliumnitrat den größten Anteil aus. Diese Aussagen stehen im Widerspruch zu den bisher beschriebenen dormanten Keimungsphänotyp von *cts1* und *cts2* (Footitt *et al.*, 2002, Fotitt *et al.*, 2006). Demnach sind die Samen nur durch eine mechanische Manipulation der Samenschale befähigt in der Gegenwart von Zucker zu keimen. Interessanterweise konnte Footitt *et al.* (2002) zeigen, dass die *cts1*-Mutante in der Gegenwart von kurzkettigen Fettsäuren und Zucker ohne eine Verletzung der Samenschale zu ca. 60-70 % keimen konnte. Darüber hinaus erhöhte die Erzeugung der Doppelmutationen *ats cts1* und *ttg1-1 cts1* das Keimungspotential in Anwesenheit von Zucker bis zu einem wildtypähnlichen Niveau. Die Einzelmutanten *ats* (*aberrant seed coat*) und *ttg1-1* (*transparent test glabra*) zeichnen sich durch eine reduzierte Samendormanz und eine veränderte Struktur der Samenschale aus (Leon-Kloosterziel *et al.*, 1996);(Debeaujon *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass die Permeabilität und Stärke der Samenschale einen entscheidenden Einfluss auf die Beendigung der Samenruhe ausübt. Die Unterschiede im Keimungsverhalten der *cts*-Mutanten zwischen dieser Studie und den Daten in der Literatur könnten also von Faktoren abhängen, die die Struktur der Samenschale beeinflussen. Zu diesen Faktoren zählen wie bereits erwähnt die Zusammensetzung des Wachstumsmediums mit dem entsprechenden pH-Wert, aber auch Lagerbedingungen des Saatgutes. Da Saatgut von verschiedenen Ernten unterschiedliches Keimungspotential in Gegenwart von Zucker aufwies, scheinen auch die Anzuchtbedingungen der Pflanzen von großer Bedeutung zu sein.

#### **4.4 ACS stimuliert transporterunabhängig den Transport von Fettsäuren durch die Membran**

Der Transporter PXA1 und die peroxisomalen LACS sind am Import von Fettsäuren in die peroxisomale Matrix beteiligt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass PXA1 und LACS aufeinander folgende Komponenten eines Stoffwechselweges darstellen. Für die weitere Charakterisierung des Fettsäureimports wurde untersucht, ob Hinweise für eine Proteininteraktion zwischen diesen Proteinen existieren. In einem ersten Versuch sollte die

*lacs6 lacs7* Doppelmutante mit ursprünglich nicht peroxisomalen LACS komplementiert werden. Dazu wurden die Proteine *EcACS* und *AtLACS4* mit einem peroxisomalen Lokalisierungssignal versehen. Als Positivkontrolle fungierte dabei das LACS7-Protein. Fulda *et al.* (2004) konnte zeigen, dass die Einzelmutanten *lacs7* bzw. *lacs6* keinen Wachstumsphänotyp aufweisen und nur die Doppelmutante *lacs6 lacs7* einen Wachstumsarrest in der Keimlingsentwicklung zeigt. Eine fehlende Komplementation sollte als Hinweis auf Protein-Protein-Interaktionen zwischen peroxisomalen LACS6 bzw. LACS7 und PXA1 gewertet werden. Überraschenderweise konnte das LACS7-Protein den *lacs6 lacs7*-Phänotyp nicht komplementieren. Da für die Komplementierung die cDNA von LACS7 verwendet wurde, fehlen möglicherweise zusätzliche regulatorische Elemente aus den Intronbereichen oder solche außerhalb des verwendeten Promotors. Es bleibt zu klären, ob die genomische DNA von LACS7 in der Lage ist, den *lacs6 lacs7*-Phänotyp zu komplementieren. In einer weiteren Studie wurde der Transport von freien Fettsäuren in mit Acyl-CoA-Synthetase (ACS)-vorbeladene Liposomen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die ACS-Aktivität einen entscheidenden Einfluss auf die Transportrate von Ölsäure ausübt. Die Aufnahme dieser langkettigen Fettsäure wird durch die Präsenz der ACS um ein Vielfaches erhöht. Durch die Aktivität der ACS werden in der Gegenwart von ATP und CoA freie Fettsäuren in Acyl-CoA-Ester überführt. Aufgrund der Bildung von Oleoyl-CoA und seiner wasserlöslichen Eigenschaften wurden die entstandenen Ester in den Liposomen zurückgehalten. Dieser Prozess wird auch als vektorielle Acylierung bezeichnet (Übersicht bei: Black und Dirusso, 2006). Das hierbei verwendete ACS-Enzym wurde aus dem Bakterium *Pseudomonas sp.* gewonnen und wurde in dieser Studie auch zur Herstellung von Acyl-CoA-Standards (C18 - C20) für HPLC-Analysen verwendet. In *E. coli* wurde die vektorielle Acylierung von langkettigen Fettsäuren ebenfalls beobachtet (Schmelter *et al.*, 2004). Die für die Umwandlung von langkettigen Fettsäuren in die entsprechenden CoA-Ester verantwortliche ACS in *E. coli* ist FadD (Klein *et al.*, 1971; Overath und Raufuss, 1967). Dieses Enzym scheint mit der inneren Plasmamembran assoziiert zu sein. Schmelter *et al.* (2004) haben Vesikel aus der inneren Plasmamembran von *E. coli* hergestellt und diese mit einer gereinigten ACS aus *E. coli* beladen. Anschließend wurden ebenfalls Transportstudien durchgeführt, die gezeigt haben, dass die Anwesenheit der ACS den Transport von langkettigen Fettsäuren fördert. Die Vesikel, die aus der inneren Plasmamembran hergestellt wurden, können jedoch noch potentielle Transportproteine enthalten. In dieser Arbeit wurde jedoch mit Liposomen gearbeitet, d.h. mit Vesikeln aus künstlichen Membranen, die keine Proteineinlagerungen enthalten. Der Transport der Fettsäuren durch die Membran erfolgte

demnach über einfache Diffusion und benötigte *per se* keine Transportproteine. Eine Interaktion zwischen dem peroxisomalen ABC-Transporter PXA1 und den peroxisomalen LACS scheint demnach für den Transport von freien Fettsäuren nicht notwendig zu sein. Eine Beteiligung des PXA1-Transporters am Transport von freien Fettsäuren bzw. Acyl-CoA-Estern kann jedoch hierbei nicht ausgeschlossen werden, da die Untersuchungen in einem künstlichen System durchgeführt wurden und man davon ausgehen muß, dass dieser Transportprozess in Pflanzen ein wesentlich komplexerer Vorgang ist.

#### **4.5 Transport von langkettigen Fettsäuren und Acyl-CoA-Estern in isolierte Peroxisomen aus *R. communis***

Intakte Peroxisomen bzw. Glyoxysomen aus *R. communis* wurden verwendet, um die Aufnahmebereitschaft dieser Organelle für freie langkettige Fettsäuren und langkettige Acyl-CoA-Ester zu vergleichen. Es wurden in dieser Studie zwei Transportversuche durchgeführt. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal beider Methoden war, dass in einem Fall die Peroxisomen zuvor über einen Percoll-Gradienten gereinigt wurden und die Menge an  $\beta$ -oxidierten Acetyl-CoA als Kriterium für den Transport der Substrate gewertet wurde. Im zweiten Fall befanden sich die Peroxisomen noch im Rohextrakt, bevor sie mit den Substraten inkubiert und anschließend über den Percoll-Gradienten gereinigt wurden. Es konnte mit beiden Methoden gezeigt werden, dass sowohl die freien als auch die aktivierten Fettsäuren in die Peroxisomen aufgenommen wurden. Im Falle der gereinigten Peroxisomen wurden jedoch die freien Fettsäuren bevorzugt transportiert, wohingegen die Peroxisomen im Rohextrakt verstärkt die Acyl-CoA-Ester transportierten.

Daraus ergeben sich zwei Interpretationsmöglichkeiten. Die erste Möglichkeit erklärt den bevorzugten Transport von Acyl-CoAs im Vergleich zu den freien Fettsäuren. Die Versuche mit den im Rohextrakt vorliegenden Peroxisomen zeigten einen deutlich verstärkten ATP-unabhängigen Acyl-CoA-Ester-Transport. Zu einem ähnlichen Befund kam auch Rothardt (2003), der den Transport von Palmitinsäure und Palmitoyl-CoA in isolierte Peroxisomen aus Rattenlebern untersucht hat. Demnach könnte es sein, dass die Acyl-CoA-Ester viel schneller in die Peroxisomen transportiert wurden als die freien Fettsäuren. Die zuvor isolierten Peroxisomen wiesen jedoch nach dem Transport des Acyl-CoA-Esters eine vergleichsweise schwächere Acetyl-CoA-Bildung auf. Es wäre möglich, dass eine hohe Konzentration an Acyl-CoA-Estern in den Peroxisomen einen inhibitorischen Effekt auf die  $\beta$ -Oxidation ausgeübt hat, so dass entsprechend weniger Acetyl-CoA entstehen konnte. Der inhibitorische

Einfluss der Palmitoyl-CoA-Konzentration auf die  $\beta$ -Oxidationsrate von isolierten jedoch nicht mehr intakten Peroxisomen aus *Helianthus annuus* wurde von Gerhardt *et al.* (1999) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Substratkonzentration über 10  $\mu$ M Palmitoyl-CoA die  $\beta$ -Oxidation blockiert wurde. Da die physiologische Konzentration der Acyl-CoA-Ester im Zytosol von *R. communis* nicht bekannt ist, könnten die in einer Konzentration von 5  $\mu$ M eingesetzten Acyl-CoA-Ester in einem zu starken Maße von den intakten Glyoxysomen aufgenommen worden sein und deshalb einen inhibitorischen Effekt auf die  $\beta$ -Oxidation ausgeübt haben. Durch die Verwendung von  $[1-^{14}\text{C}]$ -markierten Substraten war es nicht möglich, eine Akkumulation von  $\beta$ -Oxidationsintermediaten nachzuweisen, da bereits nach einem Zyklus der  $\beta$ -Oxidation die um eine C2-Einheit verkürzte Fettsäure keine radioaktive Markierung mehr trägt.

Die zweite Interpretationsmöglichkeit, die sich aus der Diskrepanz der beobachteten Ergebnisse dieser beiden Versuche ergibt, beruht auf der Annahme, dass die beiden Substrate im Rohextrakt von *R. communis* in unterschiedlicher Weise den Peroxisomen zugänglich waren. Aufgrund der unterschiedlich starken lipophilen Eigenschaften der Ausgangssubstrate wäre es möglich, dass die Ölsäure zu einem viel stärkeren Ausmaß unspezifisch an Membranen von anderen Organellen gebunden hatte, die noch im Rohextrakt anwesend waren. Darüber hinaus könnten Proteine, die Fettsäure bzw. Acyl-CoA-Ester binden können, die Konzentration der Substrate beeinflussen (Mandrup *et al.*, 1993). Die gemessene Aktivität von Thioesterasen und Acyl-CoA-Synthetasen waren jedoch so gering, dass ihr Einfluss vernachlässigbar war. Somit könnte der erhöhte Acyl-CoA-Ester-Transport darauf zurückzuführen sein, dass weniger freie Fettsäuren für den Transport zur Verfügung standen. Demnach wäre auch das gemessene Acetyl-CoA Signal auf einen erhöhten Transport von freien Fettsäuren zurückzuführen.

Aufgrund der nicht exakt bestimmaren Transportbedingungen im Rohextrakt wird die zweite Interpretationsmöglichkeit für die wahrscheinlichere gehalten. Demnach werden also freie Fettsäuren verstärkt transportiert, von peroxisomalen ACS aktiviert und über die  $\beta$ -Oxidation abgebaut.

#### **4.6 Transportuntersuchungen in Proteoliposomen**

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der Transport der beiden Substrate Ölsäure bzw. Oleoyl-CoA in proteinfreien Liposomen davon abhängt, ob die Substrate zuvor mit Rinderserumalbumin (BSA) komplexiert wurden oder nicht. Ohne eine vorausgehende

Komplexierung mit BSA war der unspezifische Transport sehr hoch. Durch eine Komplexierung der Fettsäure mit BSA wurde der Transport der freien Fettsäure herabgesetzt. Ähnliche Beobachtungen wurden von Cupp *et al.* (2004) gemacht, die ebenfalls den Transport von Ölsäure in Vesikel untersucht haben.

Die Untersuchungen an Proteoliposomen haben gezeigt, dass die in der Membran eingelagerten Proteine eine zusätzliche Barriere für die zuvor komplexierten Fettsäuren darstellen und damit eher der physiologische Zustand einer biologischen Membran widerspiegelt wird.

Nach der Rekonstitution des PXA1-Transporters in künstliche Vesikel wurde die Aufnahme von Ölsäure bzw. Oleoyl-CoA in diese Proteoliposomen verglichen. Es war kein signifikanter Unterschied in der Aufnahmerate der beiden Substrate zu verzeichnen. Der gemessene Transport erfolgte dabei PXA1-unabhängig. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass PXA1 in einer zu geringen Konzentration in den Proteoliposomen vorlag. Da PXA1 nur mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass es nur sehr schwach exprimiert wurde. Ausserdem lassen sich Membranproteine nur schwer solubilisieren. Es könnten auch wichtige regulatorische Elemente in den Proteoliposomen fehlen, die wichtig für die Aktivierung von PXA1 sein könnten. Dafür spräche die Tatsache, dass PXA1 in einem heterologen System exprimiert wurde. Dabei könnten Proteine notwendig sein, die die Fettsäuren bzw. Acyl-CoAs binden, diese zu dem Transporter transportieren und möglicherweise mit dem Transporter interagieren (Mandrup *et al.*, 1993). Ein Nachteil, der in dieser Studie verwendeten Methode von Hanning *et al.*, (1999) ist, dass das eingesetzte Detergenz zur Solubilisierung der Membranproteine in den Lipidvesikeln verbleibt und damit den Transporter negativ beeinflussen kann. Die Ultraschallbehandlung der Liposomen könnte ebenfalls zu einer teilweisen Inaktivierung der Proteine führen. Eine weitere Optimierung der Testbedingungen ist daher notwendig, um die kinetischen Konstanten über den PXA1-Transporter zu erhalten.

#### **4.7 Wachstumsverhalten der *S. cerevisiae*-Mutanten *pat1* $\Delta$ und *pat1* $\Delta$ *faa2* $\Delta$**

In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass der peroxisomale ABC-Transporter Pat1/pPat2 für den Transport von aktivierten langkettigen Fettsäuren verantwortlich ist. Mittelkettige Fettsäuren werden hingegen über einfache Diffusion oder über einen noch unbekanntem Transporter durch die Membran transloziert und von der peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetase Faa2p aktiviert. Die Mutanten *pat1* $\Delta$  bzw. *pat1* $\Delta$  *faa2* $\Delta$  zeigen auf Ölsäure-

haltigem Medium als alleiniger Kohlenstoffquelle einen charakteristischen Wachstumsphänotyp (Hetteema *et al.*, 1996). Durch Komplementation der in dieser Studie erzeugten Transportermutante *pat1Δ* bzw. der Doppelmutante *pat1Δ faa2Δ* mit dem pflanzlichen PXA1-Transporter sollten Rückschlüsse auf die Substratspezifität dieses Transporters gewonnen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Gegenwart von Ölsäure eine Komplementation nicht möglich war. Möglicherweise war die Expression der Membranproteine PXA1 bzw. Pat1p nicht ausreichend, um den Wachstumsphänotyp zu komplementieren. Eine Expression von *PXA1* bzw. *PAT1* unter einem Ölsäure-induzierbaren Promotor könnte die Lösung für eine erfolgreiche Komplementation sein.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass der Wachstumsphänotyp der untersuchten Mutanten auf einer mangelhaften Verwertung der Ölsäure beruht, die aufgrund einer vollständig oder nur teilweise blockierten  $\beta$ -Oxidation nicht abgebaut werden kann. Demnach konnten die für das Wachstum der Zellen notwendigen Kohlenstoffgerüste bzw. Stoffwechselenergie nicht bereitgestellt werden. Erdmann *et al.* (1989) zeigte, dass ein Wachstum von *S. cerevisiae* auf Minimalmedium mit 0,05 % (w/v) Hefeextrakt ohne die Zugabe von Ölsäure nicht möglich ist. Die Zellen waren nur in Gegenwart von Ölsäure in der Lage, auf diesem Medium zu wachsen. Die in dieser Studie durchgeführten Wachstumsversuche auf Ölsäure-haltigem Medium zeigten jedoch, dass das Wachstum der Mutanten nur auf der Verwertung des Hefeextraktes beruhte, da ein Wachstum ohne Hefeextrakt in der Gegenwart von Ölsäure nicht möglich war. Das unterschiedlich stark beeinträchtigte Wachstum der Mutanten steht im Zusammenhang mit einer beeinträchtigten bzw. völlig unterbrochenen  $\beta$ -Oxidation. Aufgrund der Deletion des *PAT1*-Gens bzw. einer zusätzlichen Deletion des peroxisomalen ACS-Gens *FAA2* könnte der Hefeextrakt nicht verwertet werden. Auf Laurat-haltigem Minimalmedium konnte für die *pat1Δ*-Mutante kein und für die *pat1Δ faa2Δ*-Mutante ein nur sehr schwacher Wachstumsphänotyp beobachtet werden. Obwohl in der Doppelmutante *pat1Δ faa2Δ* die Funktion der  $\beta$ -Oxidation völlig unterbrochen zu sein scheint, ist der Wachstumsdefekt in Gegenwart von Laurat wesentlich schwächer als in Gegenwart von Ölsäure. Sollte der Wachstumsphänotyp auf eine inhibitorische Wirkung der Ölsäure zurückzuführen sein, so würde den Proteinen Pat1 und Faa2 ebenfalls eine essentielle Funktion bei der Regulation des Stoffwechsels in Gegenwart von Ölsäure zukommen.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Erdmann *et al.* (1989) war der Wildtypstamm YB332 zu einem Wachstum auf Ölsäure-freien Minimalmedium mit Hefeextrakt befähigt (persönliche Mitteilung von M. Scharnewski). Lockshon *et al.* (2007) untersuchten ebenfalls die Wirkung der Ölsäure auf zahlreiche Peroxisomen-Mutanten. Interessanterweise zeigten

Deletionen von essentiellen Genen der  $\beta$ -Oxidation eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Ölsäure (Lockshon *et al.*, 2007). Demnach wäre der Schutz vor der Toxizität der Ölsäure durch die Peroxisomen offenbar sehr komplex. Die Zunahme der Sensitivität gegenüber Ölsäure wird mit einer beeinträchtigten Plasmamembran-Integrität begründet. Unter dieser Annahme könnten Pat1p/Pat2p in Kombination mit Faa2p eine wichtige Funktion in der Regulation der Zusammensetzung der Plasmamembran haben.

Die in dieser Studie ebenfalls untersuchte Metabolisierung der exogen zugeführten Linolsäure im Flüssigmedium (in Gegenwart von 0,3 % Glukose) von *pat1* $\Delta$ -, *pat1*  $\Delta$ *faa2* $\Delta$ -Zellen bzw. des Ausgangsstammes zeigte, dass diese Fettsäure von allen Zellen aufgenommen wurde. Im Wildtyp wurde die Linolsäure zu einem großen Prozentsatz in die Lipide eingebaut. In den beiden Mutanten war der Einbau von Linolsäure in die Lipide erniedrigt. Der Gehalt der ebenfalls gemessenen freien Fettsäuren war dagegen in den Mutanten erhöht. Untersuchungen zeigten, dass erhöhte Mengen an freien Fettsäuren in der Zelle toxisch sind (Oshiro *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2006). Vielleicht liegt eine Schutzfunktion der Zelle darin, die freie Ölsäure in Lipide einzubauen. Zusätzliche Studien sind jedoch notwendig, um den genauen Wirkungsmechanismus der Ölsäure auf das Wachstum der Zellen zu beschreiben.

#### **4.8 Peroxisomale ACS-Aktivität- eine notwendige Voraussetzung für die $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren in *S. cerevisiae*?**

Es wurde bisher davon ausgegangen, dass sich der Fettsäuretransport in Peroxisomen von *A. thaliana* trotz vergleichbarer Komponenten von dem in *S. cerevisiae* grundlegend unterscheidet. Während in *S. cerevisiae* Fettsäuren in Form von Acyl-CoA-Estern von dem ABC-Transporter Pat1p/Pat2p in die Peroxisomen transportiert werden und dort direkt  $\beta$ -oxidiert werden können, wurden in *A. thaliana* zwei peroxisomale Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 und LACS7 nachgewiesen, deren Aktivität neben der Funktion des ABC-Transporters PXA1 für eine erfolgreiche  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren essentiell ist (Hetteema *et al.*, 1996; Fulda *et al.*, 2004). Die Erfordernis einer peroxisomalen ACS-Aktivität wurde in *S. cerevisiae* nur für mittelkettige Fettsäuren beschrieben. Diese gelangen als freie Fettsäuren über einen noch unbekanntem Transportweg in die Peroxisomen und werden anschließend von der ACS Faa2p aktiviert (Hetteema *et al.*, 1996; Knoll *et al.*, 1994). In dieser Studie wurde der Mechanismus des Fettsäuretransportes in Peroxisomen von *S. cerevisiae* näher untersucht. Dabei stand die in der peroxisomalen Matrix vorkommende ACS Fat2p im Mittelpunkt.

Diesem Protein konnte bisher weder eine Funktion bei der Aktivierung noch beim Transport von langkettigen Fettsäuren in die peroxisomale Matrix nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Mutantanalysen deuten jedoch daraufhin, dass die peroxisomale ACS-Aktivität von Fat2p in Kombination mit dem Transporter Pat1p/Pat2 bzw. mit der ACS Faa2p für die  $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren essentiell ist. Ein Wachstum der Doppelmutanten *pat1 $\Delta$  fat2 $\Delta$*  bzw. *fat2 $\Delta$  faa2 $\Delta$*  war auf Medium mit Ölsäure nicht möglich. Die entsprechenden Einzelmutanten wiesen im Gegensatz dazu keinen Wachstumsphänotyp auf. Damit wurde gezeigt, dass die Mutante *fat2 $\Delta$*  synthetisch letal mit den Mutanten *pat1 $\Delta$*  bzw. *faa2 $\Delta$*  ist. Um die genaue Funktion von Fat2p im Import von Fettsäuren durch die peroxisomale Membran zu verstehen, wurden Aktivitätsmessungen durchgeführt. Es konnte jedoch nur eine sehr geringe ACS-Aktivität gegenüber langkettigen Fettsäuren gezeigt werden. Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften der peroxisomalen ACS Fat2p und der zytoplasmatischen ACS Fat1p wird vermutet, dass der Transport von Fettsäuren durch die peroxisomale Membran durch einen ähnlichen Mechanismus wie durch die Plasmamembran erfolgt. So konnte durch die Verwendung von radioaktiv-markierten Fettsäuren gezeigt werden, dass eine Deletion des *FAT1*-Gens zu einer beeinträchtigten Aufnahme von exogenen langkettigen Fettsäuren führte. Damit war gleichzeitig ein Wachstumsdefekt auf Ölsäure-haltigem Medium verbunden (Faergeman *et al.*, 1997). Trotz der beobachteten Fat1p-abhängigen Aufnahme von exogenen langkettigen Fettsäuren konnte keine Aktivität von Fat1p gegenüber diesen Fettsäuren nachgewiesen werden. Bisher konnte nur eine Aktivität gegenüber sehr langkettigen Fettsäuren bestimmt werden (Dirusso *et al.*, 2000; Choi und Martin, 1999; Watkins *et al.*, 1998).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *FAT1* zu stark erhöhten Gehalten an freien Fettsäuren bzw. einem insgesamt stark erniedrigten Acyl-CoA-Pool in der Gegenwart von Linolsäure führt. Da normalerweise die Konzentration freier Fettsäuren in Organismen sehr gering ist, könnte der erhöhte Fettsäure-Gehalt zu Zellschädigungen führen. Darüber hinaus war der Einbau der Linolsäure in die Lipide stark beeinträchtigt. Auch diese Daten unterstreichen die bedeutende Rolle von Fat1p im Aktivierungsprozess von langkettigen Fettsäuren. Es wird postuliert, dass Fat1p sowohl eine Transport- als auch Aktivierungsaktivität gegenüber langkettigen Fettsäuren aufweist (Zou *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2003). Für den Transport von langkettigen Fettsäuren benötigt Fat1p die Funktion der ACS Faa1p oder Faa4p (Faergeman *et al.*, 1997; Faergeman *et al.*, 2001).

Es kann nahe zu ausgeschlossen werden, dass Fat2p ein Bindeglied zwischen dem Transporter Pat1p/Pat2p und der ACS Faa2p darstellt. Unter der Annahme, dass Fat2p eine

Überträgerfunktion zwischen Pat1p/Pat2p und Faa2p hätte, würde man von der *fat2Δ* Einzelmutante den Phänotyp der *fat2Δ faa2Δ*-Doppelmutante erwarten. Es wird postuliert, dass Fat2p und Faa2p in einem gemeinsamen Stoffwechselweg arbeiten und dabei in ihrer Funktion überlappen (Abb. 29). Dafür spricht der synthetisch letale Phänotyp der *fat2Δ faa2Δ*- bzw. *pat1Δ fat2Δ*-Mutanten. In der *fat2Δ*-Einzelmutante würde die Aktivierung der langkettigen Fettsäuren von Faa2p übernommen werden, wohingegen die Aktivierung der Fettsäuren in der *faa2Δ*-Einzelmutante über Fat2p erfolgt. Wenn beide ACS-Aktivitäten fehlen, ist keine Aktivierung der Fettsäuren mehr möglich. Die Tatsache, dass die Transportermutante *pat1Δ* noch zu einem beeinträchtigtem Wachstum in der Lage ist, könnte mit einem unspezifischen Fettsäuretransport in die Peroxisomen erklärt werden, wobei die peroxisomalen ACS die Fettsäuren aktivieren. Sind sowohl das Transportergen *PAT1* als auch die peroxisomalen ACS-Gene *FAA2*- bzw. *FAT2*-Gen deletiert, ist ein Wachstum nicht mehr möglich.

Zur Verifizierung der ACS-Aktivität von Fat2p sollten die  $\beta$ -Oxidationsprodukte der Doppelmutanten (*fat2Δ faa2Δ*, *pat1Δ faa2Δ*) gemessen werden (van Roermund *et al.*, 1995). Eine Bestätigung der Ergebnisse durch diesen Test würde eine Adaption dieser neuen Erkenntnisse auf das bisherige Importmodell von Fettsäuren in Peroxisomen von *S. cerevisiae* erfordern. Demnach wäre es nunmehr fraglich, ob Pat1p/Pat2p auch tatsächlich aktivierte Fettsäuren transportiert, da eine Aktivierung der Fettsäuren in den Peroxisomen für das Wachstum der Zellen notwendig zu sein scheint.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Frage untersucht, ob die in die Peroxisomen transportierten Acyl-CoA-Ester durch eine peroxisomale Thioesterase in freie Fettsäuren und CoA gespalten werden können und eine erneute Aktivierung der Fettsäuren die Voraussetzung für die sich anschließende  $\beta$ -Oxidation sein kann. Die Deletion des *TES1*-Gens, welches für die peroxisomale Thioesterase Tes1p kodiert, hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen auf Ölsäure-haltigem Medium. Im Gegensatz dazu wurde jedoch gezeigt, dass das Wachstum der *tes1Δ*-Mutante in Gegenwart von Ölsäure beeinträchtigt war (Jones *et al.*, 1999). Da sich die Wachstumsbedingungen der Zellen in dieser Studie von denen von Jones *et al.* (1999) unterschieden, waren die Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar. Es kann somit nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die transportierten Acyl-CoA-Ester durch Thioesterasen gespalten und anschließend durch die Funktion von Faa2p bzw. Fat2p erneut aktiviert werden, um anschließend über die  $\beta$ -Oxidation abgebaut zu werden.

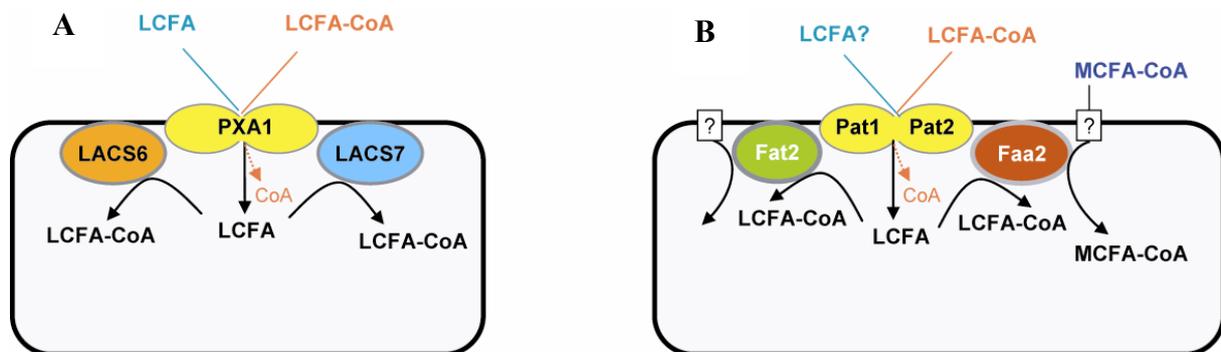
#### 4.9 Fettsäureimportmodelle in *A. thaliana* und *S. cerevisiae*

Die in dieser Studie gewonnen Erkenntnisse zum Fettsäuretransport in Peroxisomen werden in zwei Modellen zusammengefasst (Abb. 29). Dabei deuten die Ergebnisse der Untersuchungen auf einen ähnlichen Importmechanismus von Fettsäuren in Peroxisomen zwischen Pflanzen und Hefe hin. Beim pflanzlichen Importmodell reguliert der ABC-Transporter PXA1 den Transport von Fettsäuren. Dabei konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um langkettige freie Fettsäuren bzw. langkettige Acyl-CoA-Ester handelt. Die bisherigen Daten zeigen, dass sowohl freie als auch aktivierte Fettsäuren in die Peroxisomen transportiert werden. Unter der Annahme, dass Acyl-CoA-Ester transportiert werden, würden diese auf peroxisomaler Seite durch Thioesterasen hydrolysiert werden. Die entstehenden freien Fettsäuren werden anschließend durch die peroxisomale LACS6 oder LACS7 aktiviert. Die peroxisomalen LACS haben dabei überlappende Funktionen. Der Transporter PXA1 und die peroxisomalen LACS arbeiten in einem Stoffwechselweg. Für die Aktivierung der Fettsäuren sind vermutlich keine direkten Interaktionen zwischen dem PXA1-Transporter und den LACS-Proteinen notwendig. Es ist davon auszugehen, dass es keine weiteren zusätzlichen physiologisch relevanten Importmöglichkeiten gibt.

In *S. cerevisiae* sind zwei Wege für den Import von Fettsäuren beschrieben, wobei die Kettenlänge den Stoffwechselweg bestimmt. Mittelkettige Fettsäuren passieren die Membran entweder proteinvermittelt oder über einfache Diffusion, wobei anschließend eine Aktivierung dieser durch die peroxisomale ACS Faa2p erfolgt. Für den Import von langkettigen Fettsäuren in die peroxisomale Matrix ist der ABC-Transporter Pat1p/Pat2 verantwortlich. Die Proteine Pat1 und Pat2 bilden durch Dimerisation einen funktionellen Transporter aus. Als Substrat für diesen Transporter werden Acyl-CoA-Ester favorisiert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass freie Fettsäuren das Substrat für den Transporter darstellen. Wenn sich in Zukunft Fat2p als ACS bestätigen würde, wäre die Situation in Hefen ähnlich der in Pflanzen, da eine peroxisomale Aktivierung der Fettsäuren in der peroxisomalen Matrix durch Faa2p bzw. Fat2p notwendig zu sein scheint. Es wird postuliert, dass die transportierten Acyl-CoA-Ester durch eine peroxisomale Thioesterase gespalten werden und anschließend durch Fat2p oder Faa2p aktiviert werden.

Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen dienen einem besseren Verständnis des Fettsäureimportes in Peroxisomen von *A. thaliana*. Damit wurden wichtige Grundlagen für den Mechanismus der Keimung klassischer Ölsaaten geschaffen. Diese Untersuchungen sind auch im Hinblick auf die Generierung von Pflanzen interessant, die ungewöhnliche Fettsäuren

sowie einen möglichst hohen Anteil bestimmter Fettsäuren in den Speicherlipiden produzieren sollen.



**Abb. 29: Modelle für den Fettsäureimport in Peroxisomen von *A. thaliana* (A) bzw. *S. cerevisiae* (B).** **A:** Der PXA1-Transporter transportiert freie bzw. aktivierte Fettsäuren, die von den peroxisomalen LACS aktiviert werden. PXA1 und peroxisomale LACS sind aufeinander folgende Komponenten eines Stoffwechselweges. Acyl-CoA-Ester werden durch Thioesterasen auf peroxisomaler Seite gespalten und benötigen die erneute Aktivierung durch die LACS-Proteine. **B:** Der Transport der langkettigen Acyl-CoA-Ester ist abhängig von dem Transporter Pat1p/Pat2p. Die Spaltung dieser erfolgt durch eine peroxisomale Thioesterase. Die peroxisomalen ACS Fat2p bzw. Faa2p aktivieren die resultierenden freien Fettsäuren und stellen damit das Substrat für die  $\beta$ -Oxidation bereit. Fat2p und Faa2p überlappen in ihren Funktionen. Mittelkettige freie Fettsäuren passieren die Membran auf noch unbekannte Weise und werden im Anschluss von Faa2p aktiviert.

## Zusammenfassung

Fettsäuren sind essentielle Bestandteile lebender Organismen. Aufgrund der sehr geringen Wasserlöslichkeit ist der Verteilungsvorgang von Fettsäuren zwischen Zellen, als auch innerhalb einer Zelle sehr komplex. Insbesondere der Transport von Fettsäuren durch Membranen wird seit vielen Jahren erforscht, ohne dass bislang allgemein gültige Prinzipien beschrieben wurden. In dieser Arbeit wurde speziell der Transport von Fettsäuren durch die peroxisomale Membran untersucht. Der Fettsäuretransport in Peroxisomen ist eine wichtige Voraussetzung für den Abbau von Speicherlipiden während der Keimung von Ölsaaten. In *Arabidopsis thaliana* ist für diesen Transport die Funktion des peroxisomalen ABC-Transporters PXA1 essentiell. Als Substrat dieses Transporters wird in Anlehnung an die Situation in *Saccharomyces cerevisiae* eine aktivierte Fettsäure in Form von Acyl-CoA postuliert. Andererseits sind für die weitere Metabolisierung durch  $\beta$ -Oxidation die beiden peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 bzw. LACS7 notwendig. Der Transport der mit CoA aktivierten Fettsäure in die Peroxisomen und die dennoch erforderliche Aktivierung mit CoA innerhalb der Peroxisomen erscheint als Widerspruch und stellt den Ausgangspunkt der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen dar.

In *Arabidopsis thaliana* konnte durch die Erzeugung einer Dreifachmutante *lacs6 lacs7 pxa* gezeigt werden, dass sowohl die Ausgangsmutanten *lacs6 lacs7* und *pxa1-2* als auch die *lacs6 lacs7 pxa*-Dreifachmutante noch zu einem stark verlangsamten Abbau der Speicherlipid-spezifischen Eicosensäure (20:1) befähigt sind. Aus diesem Befund wurde geschlossen, dass es sich bei dem Transporter PXA1 und den peroxisomalen LACS um aufeinander folgende Komponenten eines Stoffwechselweges handelt. Der verzögerte Abbau der Triacylglyceride wird auf einen  $\beta$ -Oxidations-unabhängigen Prozess zurückgeführt, wobei die  $\alpha$ -Oxidation als alternativer Abbauweg ausgeschlossen werden konnte. Durch Bestimmung des Acyl-CoA-Pools der Mutanten war erkennbar, dass besonders sehr langkettige aktivierte Fettsäuren während der Keimlingsentwicklung akkumulierten. Die verstärkte Elongation der Fettsäuren wird als Ursache für den stark verlangsamten Abbau der Speicherlipide angenommen. Die sehr langkettigen aktivierten Fettsäuren könnten Ausgangssubstrate für die Wachssynthese bzw. für die Bildung von Sphingolipiden sein.

Mittels RT-PCR wurde die Expression der neun *LACS*-Gene während der Keimung und frühen Keimlingsentwicklung überprüft. Die Transkripte der beiden peroxisomalen *LACS* waren bereits während der Keimung nachweisbar. Zum Zeitpunkt des Triacylglycerid-Abbaus waren jedoch auch zytoplasmatische *LACS* exprimiert, so dass eine Aktivierung von

Fettsäuren im Zytosol prinzipiell möglich ist. Das Substrat für den PXA1-Transporter könnte demnach sowohl die freie als auch die aktivierte Fettsäure sein. Promotoranalysen von *PXA1* und *LACS7* zeigten während der gesamten Entwicklung in fast allen Geweben eine weitestgehend übereinstimmende Aktivität. Die beobachteten Unterschiede in der Promotoraktivität von *PXA1* und *LACS7* deuten jedoch daraufhin, dass beide Proteine auch in voneinander unabhängigen Stoffwechselwegen arbeiten. Diese Expressionsanalyse unterstreicht die wichtigen Funktionen von PXA1 und LACS7 auch über die Keimlingsentwicklung hinaus.

Die Untersuchung der Keimungsfähigkeit von verschiedenen PXA1-Transportermutanten zeigte, dass das Brechen der Samenruhe in Gegenwart von Zucker nicht wie ursprünglich angenommen von der Lage der Mutation innerhalb des Gens abhängt, sondern von Faktoren bestimmt wird, die auf die Integrität der Samenschale wirken.

Für die Bestimmung der Substratspezifität des PXA1-Transporters wurden intakte Glyoxysomen aus *Ricinus communis* für Transportversuche eingesetzt. Diese Versuche erbrachten Hinweise, dass freie bzw. aktivierte langkettige Fettsäuren von den Glyoxysomen aufgenommen werden. Hierbei konnte jedoch bisher keine eindeutige bevorzugte Aufnahme eines der beiden Substrate festgestellt werden. Zur weiteren Charakterisierung des peroxisomalen PXA1-Transporters wurde an einer Methode zur funktionellen Rekonstitution in künstlichen Lipidvesikeln (Liposomen) gearbeitet. Dazu wurde zunächst PXA1 in *Saccharomyces cerevisiae* überexprimiert und anschließend die Gesamtmembranen isoliert. Mit Hilfe von Detergenz wurden Proteine aus den Membranen gelöst und für eine Rekonstitution in Liposomen eingesetzt. In den Transportversuchen mit Proteoliposomen konnte bisher kein PXA1-abhängiger Fettsäuretransport beobachtet werden. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Membran von Liposomen ohne Proteineinlagerungen *per se* für langkettige Acyl-CoA-Ester undurchlässig ist. Freie langkettige Fettsäuren werden hingegen zu einem großen Teil unspezifisch transportiert bzw. in der Membran gebunden. Dieser unspezifische Transport konnte durch vorausgehende Komplexierung der Fettsäuren mit BSA herabgesetzt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Liposomen, welche mit einer Acyl-CoA-Synthetase vorbeladen wurden, den Transport von freien langkettigen Fettsäuren durch die Membran begünstigen. Demnach ist für den Transport von freien Fettsäuren *per se* kein Transportprotein notwendig. Es ist darüber hinaus zu vermuten, dass eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen PXA1 und den peroxisomalen LACS nicht notwendig ist.

In *Saccharomyces cerevisiae* wird der dem pflanzlichen PXA1 homologe ABC-Transporter durch die beiden Gene *PAT1* und *PAT2* kodiert. Darüber hinaus sind in der Hefe die zwei peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetasen Faa2p und Fat2p bekannt. Für Fat2p konnte jedoch bisher keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. In Wachstumsversuchen auf Ölsäure-haltigem Medium sollte überprüft werden, ob das pflanzliche PXA1 in der Lage ist, den Verlust von *PAT1* zu komplementieren. Dazu wurden zunächst die Mutanten *pat1* $\Delta$  und *pat1* $\Delta$  *faa2* $\Delta$  erzeugt und mit einem *PXA1*-tragenden Expressions-Plasmid transformiert. Eine Komplementierung konnte jedoch nicht gezeigt werden. Weitere Untersuchungen in der Hefe zeigten, dass eine Deletion des *FAT2*-Gens in Kombination mit einer *PAT1*- bzw. *FAA2*-Deletion für das Wachstum der Zellen auf Ölsäure-haltigem Medium letal ist. Aufgrund dieser beiden synthetisch letalen Phänotypen und ersten Enzymtests wird vermutet, dass es sich bei Fat2p um eine Acyl-CoA-Synthetase mit zumindest schwacher Aktivität handelt, die im bisherigen Fettsäureimportmodell nicht berücksichtigt wurde. Es wird postuliert, dass die Aktivität der Fettsäureaktivierung in den Peroxisomen von *Saccharomyces cerevisiae* im Gegensatz zur bisherigen Sichtweise möglicherweise ebenso essentiell ist, wie die der peroxisomalen LACS-Proteine in *Arabidopsis thaliana*.

## 6. Literatur

- Adlercreutz, P., Gitlesen T., Ncube I., and Read J. S. (1997) Vernonia lipase: A plant lipase with strong fatty acid selectivity. *Methods in Enzymology*. Elsevier, San Diego *Academic Press Inc* **284**:220-232.
- Antonenkov, V.D., Sormunen, R.T., and Hiltunen, J.K. (2004) The rat liver peroxisomal membrane forms a permeability barrier for cofactors but not for small metabolites in vitro. *J Cell Sci* **117**: 5633-5642.
- Beevers, H. (1979) Microbodies in higher plants. *Annu Rev Plant. Physiol* **30**: 159-197.
- Black, P.N., and Dirusso, C.C. (2006) Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation. *Biochim Biophys Acta*.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917.
- Blobel, F., and Erdmann, R. (1996) Identification of a yeast peroxisomal member of the family of AMP-binding proteins. *Eur J Biochem* **240**: 468-476.
- Bossier, P., Fernandes, L., Vilela, C., and Rodrigues-Pousada, C. (1994) The yeast *YKL741* gene situated on the left arm of chromosome XI codes for a homologue of the human ALD protein. *Yeast* **10**: 681-686.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**: 115-132.
- Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braiterman, L.T., Zheng, S., Watkins, P.A., Geraghty, M.T., Johnson, G., McGuinness, M.C., Moser, A.B., and Smith, K.D. (1998) Suppression of peroxisomal membrane protein defects by peroxisomal ATP binding cassette (ABC) proteins. *Hum Mol Genet* **7**: 239-247.
- Brzywczy J., and Paszewski A. (1999) Cloning and characterization of the *Kluyveromyces lactis* homocystein synthase gene. *Yeast* **15**:1403-1409
- Buchanan B.B., Gruissen W. and Jones R.L. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. ASPP, Waldorf, MD, 1. Auflage 456-526.

- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., and Short, J. M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-378.
- Chapman, K.D., and Trelease, R.N. (1991) Acquisition of membrane lipids by differentiating glyoxysomes: role of lipid bodies. *J Cell Biol* **115**: 995-1007.
- Chen, J.C., Tsai, C.C., and Tzen, J.T. (1999) Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell Physiol* **40**: 1079-1086.
- Choi, J.Y., and Martin, C.E. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* FAT1 gene encodes an acyl-CoA synthetase that is required for maintenance of very long chain fatty acid levels. *J Biol Chem* **274**: 4671-4683.
- Chrispeels, M.J., and Maurel, C. (1994) Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiol* **105**: 9-13.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743.
- Contreras, M., Sengupta, T.K., Sheikh, F., Aubourg, P., and Singh, I. (1996) Topology of ATP-binding domain of adrenoleukodystrophy gene product in peroxisomes. *Arch Biochem Biophys* **334**: 369-379.
- Cross, F. R. and Tinkelenberg, A. H. (1991) A potential positive feedback loop controlling *CLN1* and *CLN2* gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* **65**: 875-883.
- Cupp, D., Kampf, J.P., and Kleinfeld, A.M. (2004) Fatty acid-albumin complexes and the determination of the transport of long chain free fatty acids across membranes. *Biochemistry* **43**: 4473-4481.
- Dansen, T.B., Wirtz, K.W., Wanders, R.J., and Pap, E.H. (2000) Peroxisomes in human fibroblasts have a basic pH. *Nat Cell Biol* **2**: 51-53.
- Dean, M. (2005) The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol* **400**: 409-429.
- Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K.M., and Koornneef, M. (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**: 403-414.
- Dirusso, C.C., Connell, E.J., Faergeman, N.J., Knudsen, J., Hansen, J.K., and Black, P.N. (2000) Murine FATP alleviates growth and biochemical deficiencies of yeast fat1Delta strains. *Eur J Biochem* **267**: 4422-4433.

- Distel, B., Erdmann, R., Gould, S.J., Blobel, G., Crane, D.I., Cregg, J.M., Dodt, G., Fujiki, Y., Goodman, J.M., Just, W.W., Kiel, J.A., Kunau, W.H., Lazarow, P.B., Mannaerts, G.P., Moser, H.W., Osumi, T., Rachubinski, R.A., Roscher, A., Subramani, S., Tabak, H.F., Tsukamoto, T., Valle, D., van der Klei, I., van Veldhoven, P.P., and Veenhuis, M. (1996) A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J Cell Biol* **135**: 1-3.
- Dormann, P., Voelker, T.A., and Ohlrogge, J.B. (2000) Accumulation of palmitate in *Arabidopsis* mediated by the acyl-acyl carrier protein thioesterase FATB1. *Plant Physiol* **123**: 637-644.
- Dubois-Dalcq, M., Feigenbaum, V., and Aubourg, P. (1999) The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends Neurosci* **22**: 4-12.
- Eaton, S., Bartlett, K., and Pourfarzam, M. (1996) Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J* **320 ( Pt 2)**: 345-357.
- Engeseth, N.J., Pacovsky, R.S., Newman, T., and Ohlrogge, J.B. (1996) Characterization of an acyl-CoA-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys* **331**: 55-62.
- Erdmann, R., Veenhuis, M., Mertens, D., and Kunau, W.H. (1989) Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5419-5423.
- Ewart, G.D., Cannell, D., Cox, G.B., and Howells, A.J. (1994) Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships. *J Biol Chem* **269**: 10370-10377.
- Faergeman, N.J., DiRusso, C.C., Elberger, A., Knudsen, J., and Black, P.N. (1997) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* homologue to the murine fatty acid transport protein impairs uptake and growth on long-chain fatty acids. *J Biol Chem* **272**: 8531-8538.
- Faergeman, N.J., Black, P.N., Zhao, X.D., Knudsen, J., and DiRusso, C.C. (2001) The Acyl-CoA synthetases encoded within *FAA1* and *FAA4* in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular Utilization. *J Biol Chem* **276**: 37051-37059.
- Ferrer, I., Kapfhammer, J.P., Hindelang, C., Kemp, S., Troffer-Charlier, N., Broccoli, V., Callyzot, N., Mooyer, P., Selhorst, J., Vreken, P., Wanders, R.J., Mandel, J.L., and Pujol, A. (2005) Inactivation of the peroxisomal ABCD2 transporter in the mouse

- leads to late-onset ataxia involving mitochondria, Golgi and endoplasmic reticulum damage. *Hum Mol Genet* **14**: 3565-3577.
- Fitscher, B.A., Elsing, C., Riedel, H.D., Gorski, J., and Stremmel, W. (1996) Protein-mediated facilitated uptake processes for fatty acids, bilirubin, and other amphipathic compounds. *Proc Soc Exp Biol Med* **212**: 15-23.
- Footitt, S., Slocombe, S.P., Larner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A., and Holdsworth, M. (2002) Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the *Arabidopsis* homologue of human ALDP. *Embo J* **21**: 2912-2922.
- Fulda, M., Heinz, E., and Wolter, F.P. (1997) *Brassica napus* cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. *Plant Mol Biol* **33**: 911-922.
- Fulda, M., Shockey, J., Werber, M., Wolter, F.P., and Heinz, E. (2002) Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant J* **32**: 93-103.
- Fulda, M., Schnurr, J., Abbadì, A., Heinz, E., and Browse, J. (2004) Peroxisomal Acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 394-405.
- Gerhardt, B., Fischer, K., Deittert, M., and Wenzel, B. (1999) Substrate inhibition and affinities of the glyoxysomal beta-oxidation of sunflower cotyledons. *Planta* **209**: 355-363.
- Germain, V., Rylott, E.L., Larson, T.R., Sherson, S.M., Bechtold, N., Carde, J.P., Bryce, J.H., Graham, I.A., and Smith, S.M. (2001) Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid beta-oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **28**: 1-12.
- Graham, I.A., and Eastmond, P.J. (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog Lipid Res* **41**: 156-181.
- Guimaraes, C.P., Domingues, P., Aubourg, P., Fouquet, F., Pujol, A., Jimenez-Sanchez, G., Sa-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2004) Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1689**: 235-243.
- Guimaraes, C.P., Sa-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2005) Probing substrate-induced conformational alterations in adrenoleukodystrophy protein by proteolysis. *J Hum Genet* **50**: 99-105.
- Hamberg, M., Sanz, A., and Castresana, C. (1999) alpha-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an alpha-

- dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J Biol Chem* **274**: 24503-24513.
- Hamberg, M., Ponce de Leon, I., Rodriguez, M.J., and Castresana, C. (2005) Alpha-dioxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 169-174.
- Hamilton, J.A. (1998) Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res* **39**: 467-481.
- Hanning, I.I., Baumgarten, K., Schott, K., and Heldt, H.W. (1999) Oxaloacetate transport into plant mitochondria. *Plant Physiol* **119**: 1025-1032.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., and Nishimura, M. (1998) 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Cell* **10**: 183-195.
- Hayashi, M., Nito, K., Takei-Hoshi, R., Yagi, M., Kondo, M., Suenaga, A., Yamaya, T., and Nishimura, M. (2002) Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid beta-oxidation. *Plant Cell Physiol* **43**: 1-11.
- Heinzer, A.K., Kemp, S., Lu, J.F., Watkins, P.A., and Smith, K.D. (2002) Mouse very long-chain acyl-CoA synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy. *J Biol Chem* **277**: 28765-28773.
- Heinzer, A.K., Watkins, P.A., Lu, J.F., Kemp, S., Moser, A.B., Li, Y.Y., Mihalik, S., Powers, J.M., and Smith, K.D. (2003) A very long-chain acyl-CoA synthetase-deficient mouse and its relevance to X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* **12**: 1145-1154.
- Heldt, H. W. (1999) Pflanzenbiochemie. 2. Aufl. Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad Verl.:392
- Hettema, E.H., van Roermund, C.W., Distel, B., van den Berg, M., Vilela, C., Rodrigues-Pousada, C., Wanders, R.J., and Tabak, H.F. (1996) The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **15**: 3813-3822.
- Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., Holland, I.B., Gray, L., Buckel, S.D., Bell, A.W., and et al. (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**: 448-450.
- Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P., and Tabak, H.F. (2005) Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**: 85-95.
- Hoffman, C.S., and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.

- Hofgen, R., and Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res* **16**: 9877.
- Holdsworth, M., Kurup, S., and McKibbin, R. (1999) Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends Plant Sci* **4**: 275-280.
- Holzinger, A., Kammerer, S., and Roscher, A.A. (1997) Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **237**: 152-157.
- Hood, E., Gelvin, S. B., Melchersand, L. S., and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plant. *Transgenic research* **2**: 208-218.
- Hornung, E., Pernstich, C., and Feussner, I. (2002) Formation of conjugated Delta11Delta13-double bonds by Delta12-linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds. *Eur J Biochem* **269**: 4852-4859.
- Huang, A.H.C. (1994) Structure of plant seed oil bodies. *Curr opin Struc Biol* **4**, 493-498
- Hunt, M.C., and Alexson, S.E. (2002) The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Prog Lipid Res* **41**: 99-130.
- Imanaka, T., Aihara, K., Takano, T., Yamashita, A., Sato, R., Suzuki, Y., Yokota, S., and Osumi, T. (1999) Characterization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter. *J Biol Chem* **274**: 11968-11976.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168.
- Jansen, G.A., van den Brink, D.M., Ofman, R., Draghici, O., Dacremont, G., and Wanders, R.J. (2001) Identification of pristanal dehydrogenase activity in peroxisomes: conclusive evidence that the complete phytanic acid alpha-oxidation pathway is localized in peroxisomes. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 674-679.
- Jefferson R.A. (1987) Assaying dimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol* **5**: 387-405.
- Jimenez-Sanchez, G., Hebron, K. J., Silva-Zolezzi, I., Mihalik, S., Watkins, P., Espeel, M., Moser, A., Thomas, G., Roels, F., and Valle, D. (2000) Fasting fuel homeostasis triggered by defective phytanic and pristanic acids metabolism in the 70 kDa peroxisomal membrane protein (PMP70) deficient mice. *Ann J Hum Genet* **67**:65.

- Johnson, D.R., Knoll, L.J., Levin, D.E., and Gordon, J.I. (1994) *Saccharomyces cerevisiae* contains four *fatty acid activation (FAA)* genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. *J Cell Biol* **127**: 751-762.
- Jones, J.M., Nau, K., Geraghty, M.T., Erdmann, R., and Gould, S.J. (1999) Identification of peroxisomal acyl-CoA thioesterases in yeast and humans. *J Biol Chem* **274**: 9216-9223.
- Jung, K., Tjaden, B., and Altendorf, K. (1997) Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 10847-10852.
- Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T., and Hashimoto, T. (1990) The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J Biol Chem* **265**: 4534-4540.
- Kashiwayama, Y., Morita, M., Kamijo, K., and Imanaka, T. (2002) Nucleotide-induced conformational changes of PMP70, an ATP binding cassette transporter on rat liver peroxisomal membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 1245-1251.
- Kemp, S., Valianpour, F., Denis, S., Ofman, R., Sanders, R.J., Mooyer, P., Barth, P.G., and Wanders, R.J. (2005) Elongation of very long-chain fatty acids is enhanced in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab* **84**: 144-151.
- Kindl, H. (1987)  $\beta$ -oxidation of fatty acids by specific organelles. The biochemistry of plants; P. K. Stumpf and E. E. conn. London, *Academic Press* **9**: 31-52.
- Klein, K., Steinberg, R., Fiethen, B., and Overath, P. (1971) Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible system for the uptake of fatty acids and further characterization of old mutants. *Eur J Biochem* **19**: 442-450.
- Kleiter, A. E., and Gerhardt, B. (1998) Glyoxysomal  $\beta$ -oxidation of long-chain fatty acids: complementation of degradation. *Planta* **206**: 125-130
- Knoll, L.J., Johnson, D.R., and Gordon, J.I. (1994) Biochemical studies of three *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA synthetases, Faa1p, Faa2p, and Faa3p. *J Biol Chem* **269**: 16348-16356.
- Knoll, L.J., Johnson, D.R., and Gordon, J.I. (1995) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* strains containing *fatty acid activation* gene (*FAA*) deletions with a mammalian acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* **270**: 10861-10867.
- Koorneef, M., Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Blankestijn-de Vries, H., Debeaujon, J., Hanhart, C. J., Léon-Kloosterziel, K. M., Peeters, A. J. M., and Raz, V. (2000) The

- genetics of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. In Viemont J D and Crabbe J J (eds) Dormancy in plants. CAB, Publishing, New York, NY: 365-374.
- Kunau, W.H., Dommès, V., and Schulz, H. (1995) beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* **34**: 267-342.
- Kunst, L., and Samuels, A.L. (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog Lipid Res* **42**: 51-80.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lageweg, W., Tager, J.M., and Wanders, R.J. (1991) Topography of very-long-chain-fatty-acid-activating activity in peroxisomes from rat liver. *Biochem J* **276 ( Pt 1)**: 53-56.
- Larson, T.R., and Graham, I.A. (2001) Technical Advance: a novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant J* **25**: 115-125.
- Lasorsa, F.M., Scarcia, P., Erdmann, R., Palmieri, F., Rottensteiner, H., and Palmieri, L. (2004) The yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter: characterization of two transport modes and involvement in DeltapH formation across peroxisomal membranes. *Biochem J* **381**: 581-585.
- Lazarow, P.B., and Fujiki, Y. (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* **1**: 489-530.
- Leon-Kloosterziel, K.M., van de Bunt, G.A., Zeevaart, J.A., and Koornneef, M. (1996) *Arabidopsis* mutants with a reduced seed dormancy. *Plant Physiol* **110**: 233-240.
- Li, X., and Gould, S.J. (2002) PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J Cell Biol* **156**: 643-651.
- Liu, L.X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R., and Aubourg, P. (1999) Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J Biol Chem* **274**: 32738-32743.
- Lockshon, D., Surface, L.E., Kerr, E.O., Kaeberlein, M., and Kennedy, B.K. (2007) The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* **175**: 77-91.
- Lombard-Platet, G., Savary, S., Sarde, C.O., Mandel, J.L., and Chimini, G. (1996) A close relative of the *adrenoleukodystrophy* (*ALD*) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1265-1269.

- Mandrup, S., Jepsen, R., Skott, H., Rosendal, J., Hojrup, P., Kristiansen, K., and Knudsen, J. (1993) Effect of heterologous expression of acyl-CoA-binding protein on acyl-CoA level and composition in yeast. *Biochem J* **290** ( Pt 2): 369-374.
- McGuinness M. C., Lu J. F., Zhang H. P., Dong G. X., Heinzer A. K., Watkins P.A., Powers J. and Smith K. D (2003) Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Cell Biol* **23**(2): 744-53.
- Miernyk, J.A., Trelease, R.N., and Choinski, J.S. (1979) Malate Synthase Activity in Cotton and Other Ungerminated Oilseeds: A Survey. *Plant Physiol* **63**: 1068-1071.
- Miquel, M., and Browse, J. (1992) *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *J Biol Chem* **267**: 1502-1509.
- Moser, H.W., Loes, D.J., Melhem, E.R., Raymond, G.V., Bezman, L., Cox, C.S., and Lu, S.E. (2000) X-Linked adrenoleukodystrophy: overview and prognosis as a function of age and brain magnetic resonance imaging abnormality. A study involving 372 patients. *Neuropediatrics* **31**: 227-239.
- Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A.M., Mandel, J.L., and Aubourg, P. (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**: 726-730.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.
- Nishimura, M., Yamaguchi, J., Mori, H., Akazawa, T., and Yokota, S. (1986) Immunocytochemical Analysis Shows that Glyoxysomes Are Directly Transformed to Leaf Peroxisomes during Greening of Pumpkin Cotyledons. *Plant Physiol* **81**: 313-316.
- Oezen, I., Rossmanith, W., Forss-Petter, S., Kemp, S., Voigtlander, T., Moser-Thier, K., Wanders, R.J., Bittner, R.E., and Berger, J. (2005) Accumulation of very long-chain fatty acids does not affect mitochondrial function in adrenoleukodystrophy protein deficiency. *Hum Mol Genet* **14**: 1127-1137.
- op den Camp, R.G., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Gobel, C., Feussner, I., Nater, M., and Apel, K. (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 2320-2332.
- Overath, P., and Raufuss, E.M. (1967) The induction of the enzymes of fatty acid degradation in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **29**: 28-33.

- Overath P., Pauli G., and Schrairer H.U. (1969) Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible acyl-CoA-synthetase, the mapping of old mutations, and the isolation of regulatory mutants. *Eur J Biochem* **7(4)**: 559-74.
- Pahan, K., Khan, M., and Singh, I. (1998) Therapy for X-adrenoleukodystrophy: normalization of very long chain fatty acids and inhibition of induction of cytokines by cAMP. *J Lipid Res* **39**: 1091-1100.
- Palmieri, L., Rottensteiner, H., Girzalsky, W., Scarcia, P., Palmieri, F., and Erdmann, R. (2001) Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *Embo J* **20**: 5049-5059.
- Pujol, A., Ferrer, I., Camps, C., Metzger, E., Hindelang, C., Callizot, N., Ruiz, M., Pampols, T., Giros, M., and Mandel, J.L. (2004) Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* **13**: 2997-3006.
- Purdue, P.E., and Lazarow, P.B. (2001) Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 701-752.
- Reumann, S., Bettermann, M., Benz, R., and Heldt, H.W. (1997) Evidence for the Presence of a Porin in the Membrane of Glyoxysomes of Castor Bean. *Plant Physiol* **115**: 891-899.
- Reumann, S. (2000) The structural properties of plant peroxisomes and their metabolic significance. *Biol Chem* **381**: 639-648.
- Riggs, M.G., and McLachlan A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid miniprep. *Biotechniques* **4**: 310-313.
- Robzyk, K., and Kassir, Y. (1992) A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* **20**: 3790.
- Rosendal, J., and Knudsen, J. (1992) A fast and versatile method for extraction and quantitation of long-chain acyl-CoA esters from tissue: content of individual long-chain acyl-CoA esters in various tissues from fed rat. *Anal Biochem* **207**: 63-67.
- Rothardt, G. (2003) Transport von Fettsäuren über die Peroxisomenmembran: Funktionelle und molekulare Charakterisierung des involvierten Transporters. Doktorarbeit, Medizinische Fakultät der Universität Heidelberg
- Russell, L., Larner, V., Kurup, S., Bougourd, S., and Holdsworth, M. (2000) The *Arabidopsis* *COMATOSE* locus regulates germination potential. *Development* **127**: 3759-3767.
- Saffert, A., Hartmann-Schreier, J., Schon, A., and Schreier, P. (2000) A dual function alpha-dioxygenase-peroxidase and NAD(+) oxidoreductase active enzyme from germinating

- pea rationalizing alpha-oxidation of fatty acids in plants. *Plant Physiol* **123**: 1545-1552.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, USA
- Sanchez-Fernandez, R., Davies, T.G., Coleman, J.O., and Rea, P.A. (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276**: 30231-30244.
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-7.
- Scharnewski M. (2005) Analyse der Fettsäure-aktivierenden Reaktionen in Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Biologische Fakultät der Universität Göttingen.
- Schluter, A., Fourcade, S., Ripp, R., Mandel, J.L., Poch, O., and Pujol, A. (2006) The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. *Mol Biol Evol* **23**: 838-845.
- Schmelter, T., Trigatti, B.L., Gerber, G.E., and Mangroo, D. (2004) Biochemical demonstration of the involvement of fatty acyl-CoA synthetase in fatty acid translocation across the plasma membrane. *J Biol Chem* **279**: 24163-24170.
- Schneider, E., and Hunke, S. (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 1-20.
- Schnurr, J., Shockey, J., and Browse, J. (2004) The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 629-642.
- Shani, N., Watkins, P.A., and Valle, D. (1995) PXA1, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the human adrenoleukodystrophy gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6012-6016.
- Shani, N., Sapag, A., Watkins, P.A., and Valle, D. (1996) An *S. cerevisiae* peroxisomal transporter, orthologous to the human adrenoleukodystrophy protein, appears to be a heterodimer of two half ABC transporters: Pxa1p and Pxa2p. *Ann N Y Acad Sci* **804**: 770-772.

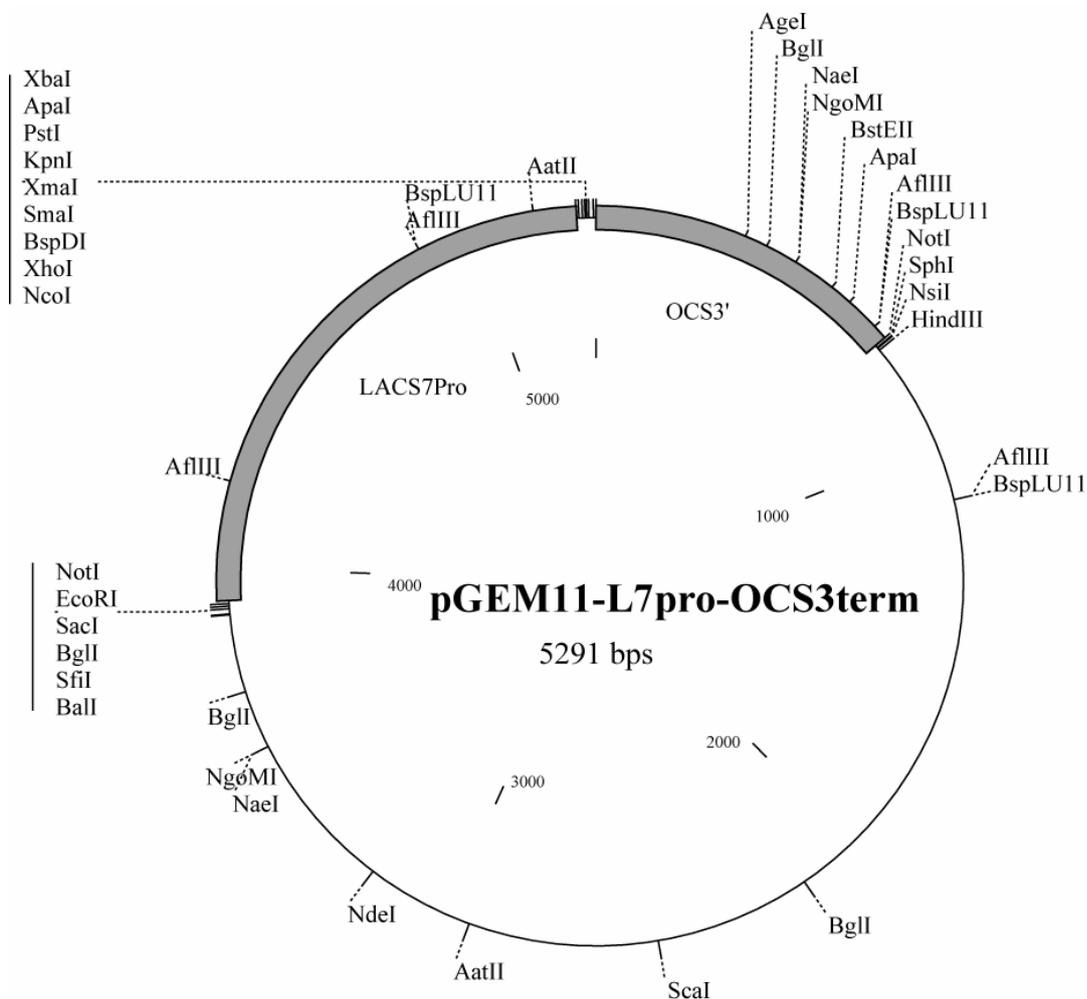
- Shani, N., Jimenez-Sanchez, G., Steel, G., Dean, M., and Valle, D. (1997) Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane. *Hum Mol Genet* **6**: 1925-1931.
- Sherman, F., Fink, G. R. and Hicks, J. B. (1986): Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Shockey, J., Schnurr, J., and Browse, J. (2000) Characterization of the AMP-binding protein gene family in *Arabidopsis thaliana*: will the real acyl-CoA synthetases please stand up? *Biochem Soc Trans* **28**: 955-957.
- Shockey, J.M., Fulda, M.S., and Browse, J.A. (2002) *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol* **129**: 1710-1722.
- Singh, I., Pahan, K., and Khan, M. (1998) Lovastatin and sodium phenylacetate normalize the levels of very long chain fatty acids in skin fibroblasts of X- adrenoleukodystrophy. *FEBS Lett* **426**: 342-346.
- Smith, B.T., Sengupta, T.K., and Singh, I. (2000) Intraperoxisomal localization of very-long-chain fatty acyl-CoA synthetase: implication in X-adrenoleukodystrophy. *Exp Cell Res* **254**: 309-320.
- Smith, K.D., Kemp, S., Braiterman, L.T., Lu, J.F., Wei, H.M., Geraghty, M., Stetten, G., Bergin, J.S., Pevsner, J., and Watkins, P.A. (1999) X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochem Res* **24**: 521-535.
- Steinberg, S.J., Kemp, S., Braiterman, L.T., and Watkins, P.A. (1999) Role of very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* **46**: 409-412.
- Subramani, S. (1998) Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol Rev* **78**: 171-188.
- Sulter, G.J., Harder, W., and Veenhuis, M. (1993) Structural and functional aspects of peroxisomal membranes in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **11**: 285-296.
- Swartzman, E.E., Viswanathan, M.N., and Thorner, J. (1996) The *PAL1* gene product is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **132**: 549-563.
- Tanaka, A.R., Tanabe, K., Morita, M., Kurisu, M., Kasiwayama, Y., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., Imanaka, T., and Ueda, K. (2002) ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and adrenoleukodystrophy protein (ABCD1). *J Biol Chem* **277**: 40142-40147.

- Theodoulou, F.L., Holdsworth, M., and Baker, A. (2006) Peroxisomal ABC transporters. *FEBS Lett* **580**: 1139-1155.
- Titorenko, V.I., and Rachubinski, R.A. (2001) The life cycle of the peroxisome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 357-368.
- Trelease, R.N., Becker, W.M., Gruber, P.J., and Newcomb, E.H. (1971) Microbodies (Glyoxysomes and Peroxisomes) in Cucumber Cotyledons: Correlative Biochemical and Ultrastructural Study in Light- and Dark-grown Seedlings. *Plant Physiol* **48**: 461-475.
- Troffer-Charlier, N., Doerflinger, N., Metzger, E., Fouquet, F., Mandel, J.L., and Aubourg, P. (1998) Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines. *Eur J Cell Biol* **75**: 254-264.
- van Roermund, C.W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R.J., and Tabak, H.F. (1995) The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *Embo J* **14**: 3480-3486.
- van Roermund, C.W., Tabak, H.F., van Den Berg, M., Wanders, R.J., and Hettema, E.H. (2000) Pex11p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **150**: 489-498.
- van Roermund, C.W., de Jong, M., L, I.J., van Marle, J., Dansen, T.B., Wanders, R.J., and Waterham, H.R. (2004) The peroxisomal lumen in *Saccharomyces cerevisiae* is alkaline. *J Cell Sci* **117**: 4231-4237.
- Van Veldhoven, P.P., Just, W.W., and Mannaerts, G.P. (1987) Permeability of the peroxisomal membrane to cofactors of beta-oxidation. Evidence for the presence of a pore-forming protein. *J Biol Chem* **262**: 4310-4318.
- Vicentini, F., and Matile, P. (1993) Gerontosomes, a multifunctional type of peroxisome in senescent leaves. *J Plant Physiol.*, **142**: 50-56.
- Vigil, E.L. (1970) Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J Cell Biol* **46**: 435-454.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**: 945-951.

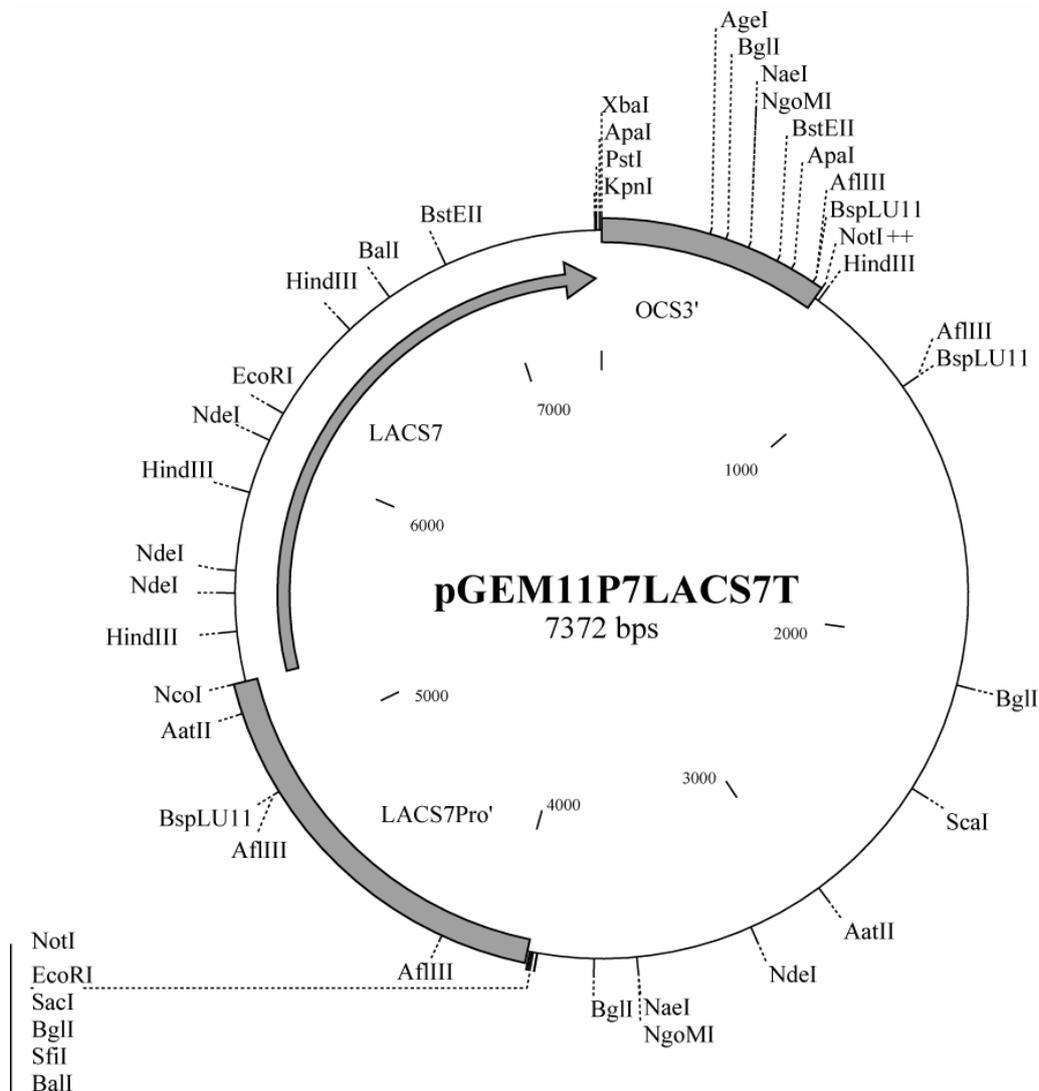
- Wanders, R.J., Visser, W.F., van Roermund, C.W., Kemp, S., and Waterham, H.R. (2007) The peroxisomal ABC transporter family. *Pflugers Arch* **453**: 719-734.
- Watkins, P.A., and Mihalik, S.J. (1990) Mitochondrial oxidation of phytanic acid in human and monkey liver: implication that Refsum's disease is not a peroxisomal disorder. *Biochem Biophys Res Commun* **167**: 580-586.
- Watkins, P.A., Lu, J.F., Steinberg, S.J., Gould, S.J., Smith, K.D., and Braiterman, L.T. (1998) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* *FAT1* gene decreases very long-chain fatty acyl-CoA synthetase activity and elevates intracellular very long-chain fatty acid concentrations. *J Biol Chem* **273**: 18210-18219.
- Weinhofer, I., Forss-Petter, S., Zigman, M., and Berger, J. (2002) Cholesterol regulates ABCD2 expression: implications for the therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* **11**: 2701-2708.
- Yamada, T., Taniwaki, T., Shinnoh, N., Uchiyama, A., Shimozawa, N., Ohyagi, Y., Asahara, H., and Kira, J. (1999) Adrenoleukodystrophy protein enhances association of very long-chain acyl-coenzyme A synthetase with the peroxisome. *Neurology* **52**: 614-616.
- Zolman, B.K., Yoder, A., and Bartel, B. (2000) Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics* **156**: 1323-1337.
- Zolman, B.K., Silva, I.D., and Bartel, B. (2001) The *Arabidopsis pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiol* **127**: 1266-1278.
- Zou, Z., DiRusso, C.C., Ctrnacta, V., and Black, P.N. (2002) Fatty acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Directed mutagenesis of *FAT1* distinguishes the biochemical activities associated with Fat1p. *J Biol Chem* **277**: 31062-31071.
- Zou, Z., Tong, F., Faergeman, N.J., Borsting, C., Black, P.N., and DiRusso, C.C. (2003) Vectorial acylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Fat1p and fatty acyl-CoA synthetase are interacting components of a fatty acid import complex. *J Biol Chem* **278**: 16414-1642.

## 7. Anhang

### 7.1 Plasmidkarten



**Abb. 30: Plasmidkarte von pGEM11-L7pro-OCS3term.** Zur Herstellung dieses Plasmides wurde zunächst der OCS3'-Terminator aus dem pART7-Vektor mit den Enzymen *XbaI* und *NotI* ausgeschnitten und in den Polylinker des zuvor ebenfalls verdauten pGEM11-Vektor (Promega, Madison, USA) ligiert. Anschließend wurde der 1322 bp lange *AtLACS7*-Promotor amplifiziert und als *EcoRI/Xho*-Fragment in den pGEM11-Vektor kloniert. Das Plasmid vermittelt eine Ampicillinresistenz. Herr Dr. M. Fulda (Universität Göttingen) stellte dieses Plasmid freundlicherweise zur Verfügung.



**Abb. 31: Plasmidkarte von pGEM11P7LACS7T.** Für die Erstellung dieses Plasmides wurde der pGEM11-L7pro-OCS3term-Vektor mit den Enzymen *NcoI* und *KpnI* geschnitten und die zuvor amplifizierte cDNA von *AtLACS7* als *NcoI/KpnI*-Fragment in diesen Vektor ligiert. Ebenso wurde die cDNA der Gene *EcACS-SKL* und *AtLACS4-SKL* als *NcoI/KpnI*-Fragment in den Vektor ligiert. Daraus resultierten die Plasmide pGEM11P7EcACS-SKL und pGEM11P7LACS4-SKL. Die Plasmide enthalten ein Gen für die Ampizillinresistenz.

## 7.2 Oligonukleotide

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide

Funktion	Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung
Überprüfung der <i>lacs6 lacs7 pxa-</i> Mutante	L6fow	TGTTGCTGGCTCCAGCTTTAGTGTGAAGT
	L6rev	AGGCAGCATTGAAGAGTCTCTCTTTCAGA
	L7fow	AGGACCAATCATCTTCAAAGGCTACTACA
	L7rev	CAAGGTGAATGGTTCTGGCACCAAAGTCA
	LBJL202	CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC
	Pxa2071	CAACGAGCGTTTGCTGCAGC
	Pxa3601	GCAGCAAAGTTGTACACCAG
	Pxa4014	CCTGCAGGTCACTCTGTTGTCTGTTCGA
Amplifizierung der neun <i>LACS</i> -Gene	Lacs1f1	ATGAAGTCTTTTGCGGCTAAGGTA
	Lacs1r328	TCCCCACTCGACTCCCAGGTTTCAG
	Lacs2f7	TTAGCCGCGGATAATGTGTTGTTG
	Lacs2r257	GCTTCCTTATATGTGATCCACGTG
	Lacs3f2	TGGCGACTGGTCGATACATCGTTG
	Lacs3r308	CCAACTCCAATAGTTCTGATAGAG
	Lacs4f4	TCGCAGCAGAAGAAATACATCTTC
	Lacs4r281	CCAAGTTTCATGACAATGTCGTAG
	Lacs5f5	CGTCGCAGAAAAGATTCATCTTTG
	Lacs5r234	GTACTTTCCTGCCTTCCCGTTTCGA
	Lacs6f50	CGCTATCCACTCTCACCTCGTCAC
	Lacs6r395	CCTAAAGCAGTTCTTGCTGTACCA
	Lacs7f10	GCTTCGCCGAACAACGTCGTCTC
	Lacs7r306	ATACTTGTTTTTCAGCATATGTTTC
	Lacs8f6	AGATTCTGGAGTGAATCCAATGGA
	Lacs8r359	TCAAACCTCCTCCCATCACTAGCA
	Lacs9f1	ATGATTCCTTATGCTGCTGGTGTT
	Lacs9r398	CGCTCTTCCGTCTTGTGCCCAATC
Amplifizierung von <i>Aktin</i>	ACT-327Sf	ATGAAGATTAAGGTCGTGGCACCACCCGA
	ACT-3`N1r	GTTTTTATCCGAGTTTGAAGAGGCTACAA

Modifizierung von pCAMBIA1302	MCSpC1	GTAAACCCATGGGGGCCCACTAGTAGTAC
	MCSpC2	TACTAGTGGGCCCCCATGGGTAAACGTAC
<i>LACS7</i> Pro- <i>GUS</i> in pC1302m	L7pGUSNcof	CGACCATGGTACGTCCTGTAGAAACCCCAACC C
	L7pGUSKpnr	CGAGGTACCTCATTGTTTGCCTCCCTGCTGCGG T
<i>PXA1</i> Pro- <i>GUS</i> in pC1302m	pxaprSacNot	CGCGAGCTCGCGGCCGCGTTGTGAAATGTGGA CGGCG
	pctsrev26805	GGATCCATGGGGCCTGGAATTGAGTATATT
<i>EcACS-SKL</i> in pGEM11-L7Pro- OCS3term	ecACSFNco	ATCCATGGAGAAGGTTTGGCTTAACCGT
	ECrSKL	GATTCGAGGTACCTCACAGTTTAGAGGCTTTAT TGTCCACTTTGCC
<i>LACS7</i> in pGEM11-L7Pro- OCS3term	lacs7fnco	TGAGACCATGGAATTTGCTTCGCCGGAACA
	lacs7rkpn	GATTCGAGGTACCTCACAGTTTAGAAGGAATG GGGTTC
<i>LACS4-SKL</i> in pGEM11-L7Pro- OCS3term	LACS4fNco	AGATCCATGGCGCAGCAGAAGAAATACATC
	larsklkpn	GATTCGAGGTACCTCACAGTTTAGACCCTCTGG AAGCAAATTTTGC
Überprüfung der Retransformanten <i>lacs6 lacs7EcACS-</i> <i>SKL</i> <i>lacs6lacs7AtLACS</i> <i>4-SKL</i> <i>lacs6lacs7LACS7</i>	ECS1	GATGGCGCTGCCGCTGTATC
	ECrSKL	GATTCGAGGTACCTCACAGTTTAGAGGCTTTAT TGTCCACTTTGCC
	L4f1264	CCAAGAAGTCTACGACATTGTCATGAAAC
	L4re5021	CATTTATGGTCTTGTACATTTTCGTCGATC
	L7fow	AGGACCAATCATCTTCAAAGGCTACTACA
L7rev	CAAGGTGAATGGTTCTGGCACCAAAGTCA	
<i>EcACS</i> in EYFP pCAT-Cfus	ecACSR EYFP	CGAGCGGCCGCTCACAGTTTAGAGGCTTTATT GTCCACTTTG
	ecACSF EYFP	GCAGCGGCCGCTATGAAGAAGGTTTGGCTTAA CCGTTAT
<i>PXA1</i> in pET42c	ASfow	CCATGGCTTCACTTCAACTATT
	ctsPaelSbf140 14	CTGAGGCATGCCCTGCAGGTCACTCTGTTGTCT GTTCGA
<i>PXA1Δ</i> 2.pHT in	ASfow	CCATGGCTTCACTTCAACTATT

pET42c	AS2100cts	<u>CCTGCAGGTCATTCCTTTCTAGCTGCAGCAA</u>
Herstellung der Knock-out Kasette für <i>PAT1</i>	YKL188C_up	GGATAATAATACAATTAAGTTACCGA
	YKL188C_do	TCCAATTTATACATGATTTGGATCCTC
Überprüfung der Deletion des <i>PAT1</i> -ORFs	YKL188C_A	TATATTCCTTCGGCGTTAATTACAA
	YKL188C_D	CAATCATCCATCTTAACACATTCAA
	YKL188C_B	TTTCTTTTCCCTCTTCAATTTTCTT
<i>PX1</i> in pRS423prom.	ASctsfBamHI	GCGGATCCATGCCTTCACTTCAACTATT
	ASctsrClal	GCATCGATTCACTCTGTTGTCTGTTCGA
<i>PAT1</i> in pRS423prom.	Pat1fBamHI	GCGGGATCCATGATCTCAACAGCTTCTGCATTTA
	Pat1rClal	GCCATCGATTTACCTCTCCTTTCCTTCTTCC
<i>FAT2</i> in pET28a	FAT2f	CGCGCATATGACAAGTGCCGCTACTGTTAGTG
	FAT2r	ACTGCGGCCGCCTACAACCTTACTCTTATTTCTGC
Herstellung der Knock-out Kasette für <i>FAT1</i>	YBR041w_up	ATTCTATATCGTTGAACTTTTAATAGGCTGCGAATACCGACTATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
	YBR041w_do	CATCCAAACCCTTTGGTAATTTTGTCTCTCTATAAACCTTCTTCAATCGATGAATTCGAGCTCG
Überprüfung der Deletion des <i>FAT1</i> -ORFs	YBR041_A	CGGATATTTCAGAATGTCAATTTTT
	YBR041_B	TGATATAACAAAACACGCTTTTCAA
	YBR041_D	AACCATTCAGTTACCGATAGTTTCA
Herstellung der Knock-out Kasette für <i>FAT2</i>	YBR222c_up	GTGCTGCAAGAGGTTAGACGCTTACGCACATTTTGTCTACAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
	YBR222c_do	GATAGAAGCTTTCAGAGAGCATAAAATTGTACAGGATACTGCCTAATCGATGAATTCGAGCTCG
Überprüfung der Deletion des <i>FAT2</i> -ORFs	YBR222c_A	TCGTCATGAGAACGACTAACAAGTA
	YBR222c_B	GACCGGTAAATAACCCTTTTGTAGT
	YBR222c_D	CATGACTTTTAATGACGGAGAACTT
Herstellung der Knock-out Kasette für <i>FAA2</i>	FAA2_UP	GATAAGAACAACCTTGTTTCGAAATATGGCCGCTCAGATTATGCCGTACGCTGCAGGTCGAC
	FAA2_DO	TTTCTAGTTTGAATGTGTTCCAAATCGTCATAAGTACCTAAAGCTATCGATGAATTCGAGCTCG
Überprüfung der	FAA2_A	TTCAGAACATCCTCCGGACCGTCAG

Deletion des <i>FAA2</i> -ORFs	FAA2_B	CTCCCAGGTGCCTGTGGCTTTATCA
	FAA2_D	ACGAGAATGGTAACTGTGACCCATG
Kontrollprimer hybridisieren auf Resistenskassetten, die zur Herstellung von Knockouts verwendet wurden	KanB2 (K2)	GTTTCCCTGCTCGCAGGTCTGCA
	hygMX4_B (K2)	GATCAGAACTTCTCGACAGAC
	clonNAT_B (K2)	TACCGGTAAGCCGTGTCGTC AAG

## **Vielen Dank**

An erster Stelle möchte ich mich bei Ivo Feußner für die Ermöglichung dieser Arbeit und sein stetes Interesse und seine vielen Anregungen bedanken.

Bei Gertrud Lohaus möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Martin Fulda unter dessen Anleitung diese Arbeit durchgeführt wurde. Es war stetiger Ansprechpartner und hat zugleich Spielräume bei der Zielsetzung und Vorgehensweise offen gehalten.

Michael Scharnewski möchte ich für die Herstellung einiger *S. cerevisiae*-Mutanten danken. Darüber hinaus werde ich mich immer gerne an Diskussionen um das Thema HSV erinnern. Danuta möchte ich für die vielen kleinen Hilfen in dieser Zeit danken und ihre ständige sehr freundliche und positive Art, die ein gemeinsames Arbeiten sehr angenehm gemacht hat. Die polnische Kultur wurde mir durch sie näher gebracht. Dziekuje!

Bei Cornelia Göbel möchte ich mich für die Einführung in die Lipidanalytik und das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken. Conny wurde mir in dieser Zeit eine gute Freundin.

Ellen Hornung danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die Berge an selbstgemachten Muffins, die ich in dieser Zeit vertilgt habe.

Sigrun Reuman stand mir bei Fragen rund um die Isolierung von Peroxisomen hilfreich zur Seite.

Gerd Marder danke ich für Beratungen in allen computertechnischen Belangen und in Sachen Musik. Heike Lott möchte ich für den ganzen Papierkram danken, denn sie für mich erledigt hat und die lustige Zeit.

Durch ihre Praktika haben mir Simone Braus und Ankathrin Förster geholfen.

Bei Gabriel Mora und Janine Reinecke gab es immer viel zu lachen und interessante Geschichten zu hören.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung Biochemie der Pflanze bedanken für die Hilfsbereitschaft und das gute Laborklima, insbesondere jedoch bei Xuan Wang, Pia Meier, Jan-Gerrit Carsjens und Maike Rudolf.

Am meisten möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich während dieser Zeit begleitet haben. Muwel, Werner, Heinrich und Helga-ich bin sehr froh das es euch gibt. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Malte bedanken.

## Lebenslauf

### Annett Struß

- 04.04.1974 geboren in Boizenburg
- 1980-1984 Grundschule Tripkau
- 1984-1990 Thomas-Münzer-Oberschule Kaarßen
- 1990-1991 Ausbildung zur Feinmechanikerin in Jena
- 1991-1994 Ausbildung zur Medizinisch-technischen-Laborassistentin in Schwerin
- 1994-1997 Berufstätigkeit als Medizinisch-technische-Laborassistentin in Schwerin
- 1993-1996 Abendgymnasium Schwerin
- 1997-2002 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen
- Nov. 2001 Diplomprüfungen (Hauptfach: Mikrobiologie; Nebenfächer: Genetik, Biochemie )
- 2002 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: „Strukturelle und funktionelle Studien zu dem neuronalen Protein Tomosyn“ angefertigt am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. R. Jahn
- Feb. 2003 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation mit dem Thema: „Fettsäureimport in die peroxisomale Matrix von *Arabidopsis thaliana*.“ am Albrecht von Haller Institut für Pflanzenwissenschaften zu Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. I. Feußner